

**Reinigung
der vier methioninspezifischen
Transfer-Ribonucleinsäuren
aus Hühnerembryonen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ulrike Faber
aus Berlin

1977
7



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549022_0010

**Reinigung
der vier methioninspezifischen
Transfer-Ribonucleinsäuren
aus Hühnerembryonen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ulrike Faber
aus Berlin

1. Referent: Professor Dr. H. J. Risse
2. Referent: Professor Dr. H. Fenner
3. Referent: Professor Dr. R. Hänsel

Tag der mündlichen Prüfung: 16. März 1977



Gedruckt mit Genehmigung des
Fachbereichs Pharmazie der
Freien Universität Berlin

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe
Assistenzprofessor Dr. Hubert Gottschling im
Institut für Molekularbiologie und Biochemie der
Freien Universität Berlin durchgeführt.

Ich danke Hubert Gottschling, Stephanie und Burghardt
Wittig und Gabriele Reimers sehr herzlich für ihre
Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit durch
anregende Diskussionen und bereitwillige Mitarbeit.

Mein Dank gilt allen Kollegen im Institut für die
gute Zusammenarbeit.

Herrn V.A. Erdmann und Herrn S. Lorenz (Max-Planck-
Institut für Molekulare Genetik, Berlin) danke ich
für die Hilfestellung bei der Durchführung der
Ribosomenbindungsexperimente.

Abkürzungen:

DNS	Desoxyribonucleinsäure
RNS	Ribonucleinsäure
mRNS	Messenger-Ribonucleinsäure
tRNS	Transfer-Ribonucleinsäure
tRNS ^{Met}	methioninspezifische tRNS
tRNS ^{Met} _f	tRNS ^{Met} , die nach Aminoacylierung enzymatisch formylierbar und an der Initiation beteiligt ist.
tRNS ^{Met} _m	tRNS ^{Met} , die nach Aminoacylierung nicht enzymatisch formylierbar und an der Elongation beteiligt ist.
(¹⁴ C)Met-tRNS ^{Met}	mit ¹⁴ C-markiertem Methionin amino- acylierte tRNS ^{Met}
fMet-tRNS ^{Met}	N-Formylmethionyl-tRNS ^{Met}
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
TCA	Trichloressigsäure
DEAE-Cellulose	Diäthylaminoäthyl-Cellulose
BD-Cellulose	Benzoylierte DEAE-Cellulose
PPO	2,5-Diphenyloxazol
POPOP	1,4-Bis-2-(4-methyl-5-phenyl- oxazolyl)-benzol

Die Abkürzungen für Aminosäuren wurden nach den Empfeh-
lungen der IUPAC-IUB Commission Biochemical Nomenclature

Symbols for Amino Acid Derivatives and Peptides

Recommendations (1971) vorgenommen.

Enzyme: L-Aminosäure:trNS-Ligase(AMP) (EC 6.1.1)
L-Methionin:trNS-Ligase(AMP) (EC 6.1.1.10)
Methionyl-trNS-Transformylase (EC 2.1.2.9)

Definition: 1 E_{260nm} -Einheit ist die Menge trNS, die,
gelöst in 1 ml 10 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl,
pH 7,0, bei 260 nm und 1 cm Lichtweg eine
Extinktion von 1 ergibt.

1 mg trNS entspricht 22 E_{260nm} -Einheiten.

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	10
2. Experimenteller Teil	17
2.1. Material	17
2.2. Methoden	19
2.2.1. Isolierung von tRNS	19
2.2.2. Aminoacylierung von tRNS	20
2.2.2.1. Analytische Aminoacylierung mit Methionin	20
2.2.2.2. Analytische Aminoacylierung mit anderen Aminosäuren	21
2.2.2.3. Präparative Aminoacylierung	22
2.2.3. Formylierung von Met-tRNS ^{Met}	23
2.2.4. Perjodatoxidation von tRNS	23
2.2.5. Synthese von 2-Naphthoxyacetyl- (¹⁴ C)Met-tRNS ^{Met}	24
2.2.6. Bindung von fMet-tRNS ^{Met} an E.coli- Ribosomen	25
2.2.7. Hydrolyse der Aminoacylesterbindung von Met-tRNS ^{Met}	25
2.2.7.1. Hydrolyse der Aminoacylesterbindung von 2-Naphthoxyacetyl-(¹⁴ C)Met-tRNS ^{Met}	25
2.2.7.2. Hydrolyse der Aminoacylesterbindung von fMet-tRNS ^{Met}	26
2.2.7.3. Bestimmung der Halbwertzeiten der Aminoacylesterbindungen bei alkalischer Hydrolyse	26

2.2.8.	Präparation von Enzymen	27
2.2.8.1.	Präparation eines L-Aminosäure:trNS- Ligase(AMP) enthaltenden Rohextrakts	27
2.2.8.2.	Präparation einer für L-Methionin:trNS- Ligase(AMP) angereicherten Fraktion	28
2.2.8.3.	Präparation eines Enzymrohextrakts aus E.coli	28
2.2.9.	Synthese des 2-Naphthoxyacetylesters von N-Hydroxysuccinimid	29
2.2.10.	Synthese von $N^5, N^{10}-(^{14}C)$ Methenyltetrahydrofolat	30
2.2.11.	Chromatographieverfahren	32
2.2.11.1.	Chromatographie an BD-Cellulose	32
2.2.11.2.	Reversed-Phase-5-Chromatographie	33
2.2.11.3.	Papierchromatographie	35
2.2.12.	Polyacrylamidgel-Elektrophorese	35
3.	Ergebnisse	37
3.1.	Reinigung der vier trNS ^{Met} -Einzelspezies	37
3.1.1.	Herstellung einer Gesamt-trNS-Präparation und Abtrennung von trNS ^{Phe}	37
3.1.2.	Abtrennung der methioninspezifischen trNS von übriger trNS	39
3.1.2.1.	Vorversuche zur Aminoacylierung	41
3.1.2.2.	Vorversuche zur Derivatisierung	43
3.1.2.3.	Hauptversuch: Aminoacylierung, Derivati- sierung und BD-Cellulose-Chromatographie	45
3.1.3.	Isolierung der trNS ^{Met} - Einzelspezies	48

3.2.	Eigenschaften der tRNS ^{Met} -Einzelspezies	50
3.2.1.	Polyacrylamidgel-Elektrophorese der tRNS ^{Met} -Einzelspezies	50
3.2.2.	Kontamination der vier tRNS ^{Met} -Einzel- spezies durch andere tRNS	52
3.2.3.	Kontamination der Einzelspezies untereinander	54
3.2.4.	Bestimmung der Halbwertzeiten der Amino- acylesterbindungen bei alkalischer Hydrolyse	58
3.2.5.	Untersuchungen zur Frage nach der Initiatorspezies	60
3.2.5.1.	Heterologe Aminoacylierung	60
3.2.5.2.	Formylierung	61
3.2.5.3.	Ribosomenbindung	66
4.	Diskussion	68
5.	Zusammenfassung	79
6.	Literaturverzeichnis	82

1. Einleitung

Die genetische Information für Proteine, die, entsprechend dem genetischen Code verschlüsselt, in der DNS als Sequenz von Nucleotid-Triplets gespeichert ist, wird in die komplementäre Nucleotid-Triplet-Sequenz der mRNA übertragen und schließlich durch Übersetzung der Nucleotid-Triplet-Sequenz in die definierte Aminosäuresequenz in spezifischen Proteinen ausgeprägt.

Die Übersetzung der genetischen Information, der Übergang also von einem makromolekularen System (Nucleinsäuren) in ein anderes (Proteine), erfordert die Beteiligung einer besonderen Klasse von Nucleinsäuren, der Transfer-Ribonucleinsäuren (1). Sie können einerseits jeweils durch eine sehr komplexe Enzymreaktion, die Aminoacylierung, mit der durch den genetischen Code definierten Aminosäure verknüpft werden (Adaptation und Aktivierung der Aminosäuren). Sie können andererseits mit Hilfe der Ribosomen über ein exponiertes Nucleotid-Triplet ihrer Nucleotidkette (Anticodon), das dem jeweiligen Codon der mRNA komplementär ist, mit der mRNA in Wechselwirkung treten und am Ribosom vorübergehend die wachsende Polypeptidkette tragen.

Für die Adaptation der zwanzig codierten Aminosäuren sind mindestens zwanzig spezifische tRNA-Arten erforderlich. Es gibt jedoch in den meisten Fällen mehr als eine tRNA für eine Aminosäure (isoakzeptierende tRNA-Spezies)

mit unterschiedlichen Anticodon-Triplets, weil aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes mehrere unterschiedliche Codon-Triplets für eine Aminosäure codieren (2). Darüber hinaus ist die Vielfalt der isoakzeptierenden tRNS-Spezies wesentlich größer, als allein nach der Degeneriertheit des genetischen Codes erforderlich. Eine Vielzahl von isoakzeptierenden tRNS-Spezies ist dargestellt und gereinigt worden (z.B. 3,4,5,6).

Neben der bisher am besten verstandenen und sicher auch wichtigsten Rolle der tRNS als eines aktiven Aminosäureadaptors in der ribosomalen Proteinsynthese sind viele weitere Funktionen der tRNS gezeigt worden, die möglicherweise die große Zahl der isoakzeptierenden Spezies erklären könnten oder erforderlich machen. Vor allem gibt es eine Reihe von Beispielen dafür, daß tRNS an der Regulation im Zellgeschehen beteiligt ist (7,8,9): Veränderungen in der Population isoakzeptierender tRNS-Spezies wurden während der Entwicklung, Neoplasie und Virusinfektion von Mammalierzellen nachgewiesen. In einigen Geweben mit massiver De-novo-Synthese spezifischer Proteine kann diese Population mit der Aminosäurezusammensetzung des synthetisierten Proteins korreliert werden. So ist z.B. der Anteil der prolinspezifischen tRNS im granulierenden (Kollagen bildenden) Gewebe der Ratte erhöht (10). In der Seidenraupe *Bombyx mori* wird zum Zeitpunkt der Synthese des Seidenproteins Fibroin, welches viel Alanin, Glycin,

Serin und Tyrosin enthält, das Muster der entsprechenden isoakzeptierenden tRNS-Spezies spezifisch verändert und gleichzeitig nur eine der isoakzeptierenden tRNS^{Gly}-Spezies für den Einbau von Glycin verwendet (11). In Interferon-behandelten Mäuse-L-Zellen ist die Translation verschiedener mRNS-Arten vollständig abhängig von tRNS^{Leu}-Spezies, die nur 5 % der übrigen isoakzeptierenden tRNS^{Leu}-Spezies ausmachen (12).

tRNS spielt auch eine Rolle bei der spezifischen Modifizierung von Proteinen (13), sie ist an der nicht-ribosomalen Synthese bakterieller Zellwandpeptide beteiligt (13,14) und dient bei RNS-Viren als Startsignal für eine Polymerase, die an RNS eine DNS-Kopie synthetisiert (15).

Innerhalb der ribosomalen Proteinsynthese stellen die für eine Aminosäure spezifischen, isoakzeptierenden tRNS-Spezies ihre Aminosäure für die Elongation der Polypeptidkette zur Verfügung. Sie haben in dieser Hinsicht alle die gleiche Funktion. Im Unterschied dazu erfüllen allein die isoakzeptierenden Spezies der methioninspezifischen tRNS verschiedene Aufgaben im ribosomalen Synthesegeschehen und lassen sich zwei funktionell unterschiedlichen Klassen zuordnen: 1.) die an der Initiation der Synthese einer neuen Polypeptidkette beteiligte tRNS^{Met}_f (Initiator-tRNS), 2.) die an der Elongation der wachsenden Polypeptidkette beteiligte tRNS^{Met}_m. Die verschiedenen Funktionen der iso-

akzeptierenden tRNS^{Met} - Spezies konnten erkannt werden, als Marcker und Sanger (16) eine N-formylierte Met-tRNS in *Escherichia coli* entdeckten und diese N-Formylmethionyl-tRNS^{Met}- Spezies durch die nachfolgenden Arbeiten von Marcker (17), Clark und Marcker (18,19) und Adams und Capecchi (20) als Initiator-tRNS charakterisiert wurde. Die exakte Erkennung des Startpunkts auf der mRNA zur Synthese einer neuen Polypeptidkette ist für die Ausprägung der genetischen Information von entscheidender Bedeutung. Um so überraschender ist die Entdeckung, daß diese entscheidende Aufgabe einer isoakzeptierenden tRNS-Spezies zufällt, die sich allerdings in wesentlichen Eigenschaften von allen anderen tRNS-Spezies unterscheidet. Als Startsignal für die Initiation der Proteinsynthese dient das Startcodon AUG, vereinzelt auch GUG, auf der mRNA, an das $\text{tRNS}_f^{\text{Met}}$ mit dem Anticodon CAU (U in einigen Fällen modifiziert) binden kann. Die Initiation ist ein hochspezifisches Zusammenspiel zwischen verschiedenen Reaktionspartnern: dem Startcodon, der Met-tRNS^{Met}_f, dem Ribosom mit seiner kleinen und großen Untereinheit, GTP und einigen löslichen Proteinfaktoren, den Initiationsfaktoren (19,20, 21,22). Die Initiationsfaktoren sind an der spezifischen Bindung der $\text{tRNS}_f^{\text{Met}}$ bei der Ausbildung des Initiationskomplexes beteiligt. Gleichzeitig kann mit Hilfe der Initiationsfaktoren das Triplet AUG, das auch für Methionin in internen Positionen der mRNA codiert, als Startcodon diskrimi -

niert werden, wenn es am Anfang eines Cistrons erscheint.

Am Ribosom existieren zwei Bindungsbereiche für tRNS, der Aminoacyl-tRNS-Akzeptorbereich (A-site) und der Peptidyl-tRNS-Akzeptorbereich (P-site). Im Unterschied zu jeder anderen Aminoacyl-tRNS bindet Met-tRNS_f^{Met} beim Eintritt ins Ribosom sofort in der P-site (21,22,23).

Bei Prokaryonten wird die Met-tRNS_f^{Met} an der Aminogruppe des Methionins formyliert (17,18,19,23). In Eukaryonten dagegen wird eine solche Formylierung nicht gefunden (24,25), aber eukaryote tRNS_f^{Met} kann durch Enzyme aus E.coli aminoacyliert und formyliert werden (23,26,27).

Eine Ausnahme scheinen die Initiatorspezies pflanzlichen Ursprungs zu sein, die zwar mit L-Methionin:tRNS-Ligase (AMP) aus E.coli aminoacyliert, nicht jedoch mit der entsprechenden Methionyl-tRNS-Transformylase formyliert werden können (24,28,29). Während zunächst angenommen wurde, daß die Blockierung der Aminogruppe des Methionins durch den Formylrest von entscheidender Bedeutung für die Erkennung und Funktion der tRNS_f^{Met} ist, konnte inzwischen nachgewiesen werden, daß die besondere Basensequenz dieser Spezies und wahrscheinlich verschiedene Molekülstrukturen eine wesentliche Rolle für die Initiatorfunktion spielen (30). So kann nicht formylierte Met-tRNS_f^{Met} an 30S ribosomale Untereinheiten (E.coli) binden (30) und fehlbeladene fVal-tRNS_f^{Met} Initiatorfunktion ausüben (31), während andere formylierte Aminoacyl-tRNS einschließlich der

fMet-tRNS_m^{Met} keinen Initiationskomplex bilden kann (23).

Die Basensequenzen der tRNS_f^{Met} aus einigen Organismen konnten aufgeklärt werden: Bakterien (32,33), Einzeller (34), niederes Vertebraten- (35), Mammalier- und Human- gewebe (36-38). Die Basensequenz der tRNS_f^{Met} aus dem Cytoplasma von Eukaryonten ist über den langen Evolutionszeitraum von 500 Millionen Jahren konserviert worden (35), da gezeigt werden konnte, daß die Spezies aus Lachsleber und -testes dieselbe Sequenz haben wie die aus Human-placenta, Kaninchen und Schaf.

Die zweite Klasse der methioninspezifischen tRNS, tRNS_m^{Met}, ist bei weitem nicht so gründlich untersucht worden wie die Initiatorspezies tRNS_f^{Met}. tRNS_m^{Met} fügt Methionin in die wachsende Polypeptidkette ein. Auch tRNS_m^{Met} besitzt das Anticodon CAU. Sie kann damit nur an internes AUG binden, aber im Unterschied zu tRNS_f^{Met} nicht an das Valin-codon GUG (18,39). Erst wenige Basensequenzen von tRNS_m^{Met} aus unterschiedlichen Organismen sind aufgeklärt worden: E.coli (40), Hefe (41), Maus-Myelom (42), Hühnerembryonen-fibroblasten (43) und Rattenleber (44). Diese bisher mög-lichen Vergleiche deuten, ähnlich wie bei tRNS_f^{Met}, auf eine weitgehende Identität der Basensequenzen von tRNS_m^{Met} aus dem Cytoplasma eukaryoter Organismen hin.

Über die Bedeutung der isoakzeptierenden tRNS_f^{Met} bzw. tRNS_m^{Met} - Spezies ist nichts bekannt. Während die meisten

untersuchten Organismen eine einzige $\text{tRNA}_{\text{f}}^{\text{Met}}$ -Spezies besitzen, konnten in dem Prokaryonten *Mycoplasma mycoides* var. *capri* (45) und in den Mitochondrien der Bohne *Phaseolus vulgaris* (46) jeweils zwei $\text{tRNA}_{\text{f}}^{\text{Met}}$ -Spezies voneinander getrennt werden. $\text{tRNA}_{\text{m}}^{\text{Met}}$, die in *E.coli* und Hefe durch eine Spezies repräsentiert ist, konnte in vielen Eukaryonten in mehrere (bis zu vier) isoakzeptierende Einzelspezies aufgetrennt werden (35,47,48,49).

Um mehr über die Bedeutung isoakzeptierender tRNA zu erfahren, müssen diese Spezies in ihren molekularen Eigenschaften und biologischen Funktionen verglichen werden. Das setzt die Reinigung der isoakzeptierenden Spezies voraus.

Wie aus Vorversuchen der Arbeitsgruppe hervorging, zeigt die tRNA-Population in der Muskulatur 13 Tage alter Hühnerembryonen nach der hochauflösenden Reversed-Phase-5-Chromatographie vier Verteilungen für Methionin-Akzeptorkapazität. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Reindarstellung der vier tRNA^{Met} -Verteilungen, ihre Bestimmung als vier voneinander verschiedene Einzelspezies und die jeweilige Zuordnung zu der funktionellen Klasse $\text{tRNA}_{\text{f}}^{\text{Met}}$ oder $\text{tRNA}_{\text{m}}^{\text{Met}}$. Die in den letzten Jahren entwickelten Chromatographieverfahren haben für die Darstellung und Reinigung von tRNA-Spezies große Fortschritte gebracht. So kann $\text{tRNA}_{\text{f}}^{\text{Met}}$ aus den meisten Organismen über nur drei chromatographische

Schritte (BD-Cellulose-, DEAE-Sephadex- und Reversed-Phase-5-Chromatographie) gereinigt werden (24,49). Das ist möglich, weil diese Spezies bei der Chromatographie an BD-Cellulose in allererster Position eluiert wird, während sie an DEAE-Sephadex fester haftet als andere tRNS. Die gemeinsame Reinigung aller isoakzeptierenden tRNS^{Met}-Spezies jedoch ist durch chromatographische Methoden allein nicht möglich, da ihre Verteilung in einem breiteren Elutionsbereich liegt, sodaß auch bei Kombination unterschiedlicher Chromatographieschritte immer wieder mehrere tRNS-Arten in gleichen Positionen wie die tRNS^{Met}-Spezies eluiert werden. Daher mußte für die gleichzeitige Reinigung aller isoakzeptierenden Spezies der tRNS^{Met} eine kompliziertere Methodik zugrunde gelegt werden, die sich der Kombination biologischer, chemischer und chromatographischer Schritte bediente.

2. Experimenteller Teil

2.1. Material

Die Materialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

L-(1-¹⁴C)Methionin (60 Ci/Mol), L-(U-¹⁴C)Methionin (260 Ci/Mol), L-(2(n)-³H)Methionin (2 Ci/mMol), N-Formyl-L-(Methyl-¹⁴C)Methionin (56 Ci/Mol); Amersham-Buchler,

Braunschweig.

(¹⁴C)Formaldehyd (44 Ci/Mol), ¹⁴C-Aminosäuren (100 Ci/Mol);

NEN, Dreieichenhain.

Formylmethioninspezifische tRNS aus E.coli (1500 pMol/
E_{260nm}-Einheit); Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim.
Desoxyribonuclease I, Code DPFF; Worthington Biochemical
Corp.

DC-Alufolie Cellulose, Ninhydrin-Sprühareagenz 0,1 %;
Merck, Darmstadt.

Cellulose, DEAE-Cellulose, BD-Cellulose, Citrovorum
Faktor, Ca-Salz (Leucovorin), Acrylamid, N,N'-Methylen-
bisacrylamid, Temed; Serva, Heidelberg.

Sephadex G-25; Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden.
dl,L-Tetrahydrofolsäure; Sigma, München.

N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, N-Hydroxysuccinimid,
2- Naphthoxyessigsäure; Schuchardt, München.

Alle anderen Chemikalien und Lösungsmittel wiesen den
Reinheitsgrad p.A. auf.

In Synthesen verwendetes Tetrahydrofuran und Dioxan
wurden getrocknet und über Molekularsieben aufbewahrt.
Peroxidfreier Äther wurde jeweils frisch geöffneten
Flaschen "Äther p.N." entnommen.

Plaskon CTFE und Adogen 464 für die Herstellung des
Reversed-Phase-5-Harzes erhielten wir von Dr. J.F. Weiss
(Chemical Technology Division, Oak Ridge National
Laboratory).

2.2. Methoden

2.2.1. Isolierung von tRNS

Eine Gesamt-tRNS-Präparation aus der Muskulatur 13 Tage alter Hühnerembryonen wurde in Anlehnung an die Methode von Zubay (50) hergestellt. Die Embryonen wurden den bebrüteten Eiern entnommen, nach Entfernung des Kopfes 1-2 Minuten ausgeblutet und von Eingeweiden und Extremitätenenden befreit. Die Rumpfe wurden in eiskalter 0,9 % NaCl-Lösung gespült, sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -30°C aufbewahrt.

Das gefrorene Material wurde 10-15 Sekunden in einem vorgekühlten Waring blender pulverisiert, unmittelbar in eine Mischung aus 80 % redestilliertem Phenol und 0,15 M NaCl (1:1, v/v) mit 15 mM Mg-Acetat überführt und 1 Stunde bei Raumtemperatur kräftig gerührt. Durch Zentrifugation wurden Knochen und Zellbruchstücke sedimentiert, die Phasen getrennt und die Nucleinsäuren aus der wäßrigen Phase gewonnen. Nach wiederholten Phenolextraktionen zur Denaturierung und Entfernung der Proteine wurden die Nucleinsäuren durch Äthanol-fällung konzentriert und in 0,3 M Na-Acetat-Puffer, pH 7, gelöst. Aus dieser Lösung wurde tRNS durch differentielle 2-Propanolfällung bei Raumtemperatur von höhermolekularen Nucleinsäuren abgetrennt. Die tRNS-Fraktion wurde ausgiebig gegen Wasser dialysiert und bei -30°C aufbewahrt.

2.2.2. Aminoacylierung von tRNS

2.2.2.1. Analytische Aminoacylierung mit Methionin

Die Aminoacylierung von tRNS^{Met} wurde in Ansätzen von 0,3 ml, 0,15 ml oder 0,06 ml bei folgenden Endkonzentrationen durchgeführt:

50 mM Tris-HCl, pH 8,2

5 mM MgCl₂

8 mM ATP

8,3 μ M (¹⁴C)Methionin oder (³H)Methionin

Die spezifischen Radioaktivitäten lagen bei 50 Ci/Mol oder 260 Ci/Mol für ¹⁴C und bei 1 Ci/mMol für ³H. Verdünnungen wurden in 20 mM 2-Mercaptoäthanol vorgenommen, aus dem gelöster Sauerstoff durch Einleiten von Stickstoff verdrängt worden war. Solche Methioninlösungen waren mehrere Monate haltbar. Die chemische Reinheit wurde in geeigneten Zeitabständen papierchromatographisch überprüft. Nur solche Lösungen wurden verwendet, die nicht mehr als 10 % Methioninsulfoxid bzw. Methioninsulfon enthielten.

Ligase und tRNS wurden, wenn nicht anders angegeben, 3 Minuten bei 37°C präinkubiert. Dann wurde die Aminoacylierungsreaktion durch Zugabe eines Reaktionsgemisches aus MgCl₂, ATP und (¹⁴C)Methionin in Tris-Puffer gestartet. Die säurefällbare Radioaktivität in (¹⁴C)Met-tRNS^{Met} wurde nach der Methode von Bollum (51) bestimmt. Nach geeigneten Reaktionszeiten wurden jeweils 50 μ l (bei klei-

neren Ansätzen 25 bzw. 10 μ l) entnommen und auf einem Papierrundfilter ($\varnothing$ 22 mm) verteilt. Die Filterplättchen wurde sofort in eiskalte 10 % TCA-Lösung (10 ml pro Plättchen) geworfen, bei 0°C dreimal im gleichen Volumen 5 % TCA, je einmal in Äthanol, Äthanol/Äther (1:1,v/v) und Äther gewaschen und getrocknet. Die auf den Filtern haftende Radioaktivität wurde in 5 ml Szintillationslösung (4 g Omnifluor, 100 g Naphthalin, Dioxan ad 1 l) in einem Nuclear Chicago Isocap/300-Flüssigkeits-szintillationssystem gemessen.

2.2.2.2. Analytische Aminoacylierung

mit anderen Aminosäuren

In Vorversuchen wurde das jeweilige optimale Mg^{2+} /ATP-Konzentrationsverhältnis für die Aminoacylierungsreaktion von 14 Aminosäuren bei pH 7,4 ermittelt. Die Aminosäuren mit nahe beieinanderliegenden Optima ihrer Ligasen wurden in Gruppen zusammengefaßt (Tabelle 1).

Tabelle 1. Mg^{2+} /ATP-Konzentrationen der Aminosäuregruppen

Aminosäuren	Mg^{2+} (mM)	ATP (mM)
Glycin, Valin, Arginin	20	5
Alanin, Histidin, Asparagin	25	2
Threonin, Glutamin	5	5
Asparaginsäure, Prolin, Lysin	5	2
Isoleucin, Serin, Glutaminsäure	10	6

Die Konzentration jeder einzelnen Aminosäure war 20 μM , die spezifische ^{14}C -Aktivität 100 Ci/Mol. In dem verwendeten Enzymrohextrakt wurden die Aminosäure:trNS-Ligase-(AMP)-Aktivitäten für alle zu testenden Aminosäuren nachgewiesen. Von 60 μl -Ansätzen wurden nach 20 Minuten Inkubation 50 μl auf Papierplättchen verteilt und weiter behandelt und ausgewertet wie unter 2.2.2.1. beschrieben.

2.2.2.3. Präparative Aminoacylierung

Um eine Präparation von Met-tRNS^{Met} herzustellen, wurde die Aminoacylierung der trNS unter gleichen Bedingungen wie im analytischen Ansatz durchgeführt. Nach 15 Minuten Inkubation wurde der Reaktionsansatz schnell auf 0°C abgekühlt, sofort mit einem Fünftel seines Volumens Na-Acetat-Puffer (1 M Na-Acetat, 10 mM MgCl_2 , pH 5) und dem gleichen Volumen 80 % redestilliertem Phenol versetzt. Es wurde 20 Minuten bei 4°C kräftig geschüttelt und 20 Minuten zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde von der Interphase denaturierter Proteine und der Phenolphase vorsichtig abgehoben und bei 0°C aufbewahrt. Nach Re-extraktion der Phenolphase mit einem halben Volumen Na-Acetat-Puffer wurde Met-tRNS^{Met} aus den vereinigten wäßrigen Phasen mit zwei Volumen Äthanol (-30°C) gefällt. Nach mindestens zwei Stunden bei -30°C wurde der Niederschlag abzentrifugiert und in einem für die weitere Verwendung geeigneten Puffer gelöst. Um Reste von Phenol zu

entfernen, wurde die Lösung viermal mit dem gleichen Volumen peroxidfreiem Äther ausgeschüttelt und restlicher Äther mit N_2 ausgeblasen. Auf diesem Wege konnten 80-85 % der nach 15 Minuten Inkubation aminoacylierten tRNS isoliert werden.

2.2.3. Formylierung von Met-tRNS^{Met}

Die Formylierung von Met-tRNS^{Met} wurde mit der Aminoacylierung in einem Ansatz durchgeführt, wie von Caskey et al. (26) beschrieben. Dem Aminoacylierungsansatz (siehe 2.2.2.1) wurde N^5, N^{10} -Methenyltetrahydrofolat zu einer Endkonzentration von 10 μ M beigegeben, aus dem beim pH-Wert des Reaktionsansatzes durch Öffnung der Methenylbrücke das N^{10} -Formylderivat als biologisch wirksamer Formyldonor entsteht. In Experimenten mit radioaktivem N^5, N^{10} -Methenyltetrahydrofolat wurde (^{14}C)Methionin durch nicht radioaktives Methionin ersetzt und in Parallelversuchen die Aminoacylierung mit (^{14}C)Methionin getrennt gemessen. Der hier verwendete Enzymrohextrakt aus E.coli (siehe 2.2.8.3.) enthielt die Enzyme L-Methionin:tRNS-Ligase(AMP) und Methionyl-tRNS-Transformylase.

2.2.4. Perjodatoxidation von tRNS

Die cis-Diol-Funktion der 3'-terminalen Ribose wurde nach der Methode von Preiss et al. (52) mit Natriumperjodat oxidiert. Eine wäßrige Lösung von tRNS aus E. coli

(33 E_{260nm} -Einheiten) wurde ausgiebig gegen Acetat-Puffer (0,1 M Essigsäure, 10 mM $MgCl_2$, pH 5) dialysiert. Das Dialysat (0,6 ml) wurde mit 0,06 ml 0,1 M $NaJO_4$ in Acetat-Puffer versetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Hinzufügen von 0,132 ml 1 M KCl wurde dann 10 Minuten in Eiswasser gekühlt und die tRNS mit zwei Volumen Äthanol (-30°C) gefällt.

2.2.5. Synthese von 2-Naphthoxyacetyl-(^{14}C)Met-tRNS^{Met}
2-Naphthoxyacetyl-(^{14}C)Met-tRNS^{Met} wurde in Anlehnung an die von Gillam et al. (53) beschriebene Methode synthetisiert. 1710 E_{260nm} -Einheiten Gesamt-tRNS wurden mit (^{14}C)Methionin aminoacyliert, deproteinisiert und nach Äthanol-fällung in 5 ml Puffer (0,5 M Triäthanolaminhydrochlorid, 10 mM $MgCl_2$, pH 4,5) gelöst. Diese Lösung wurde auf 0°C gekühlt (Kühlsole) und mit 15 mg des 2-Naphthoxyacetylesters von N-Hydroxysuccinimid, gelöst in 1 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran, versetzt. Innerhalb 1 Minute wurde mit 1,3 ml 1 N NaOH auf pH 8,6 eingestellt. Nach 5 Minuten wurden unter weiterem Rühren erneut 15 mg aktiver Ester in 1 ml Tetrahydrofuran zugegeben. Mit 0,05 ml 1 N NaOH wurde wieder auf pH 8,6 eingestellt, weitere 5 Minuten bei 0°C gerührt und dann mit 0,8 ml Eisessig auf pH 4,5 gebracht. Aus dem Gesamtvolumen von 9,15 ml wurden 2-Naphthoxyacetyl-(^{14}C)Met-tRNS^{Met} und andere tRNS mit dem doppelten Volumen Äthanol (-30°C) gefällt.

2.2.6. Bindung von fMet-tRNS^{Met} an E.coli-Ribosomen

Die Bindung von fMet-tRNS^{Met} an Ribosomen wurde in 80 µl-Ansätzen bei folgenden Endkonzentrationen durchgeführt (54):

75 mM Tris-HCl, pH 7,8

80 mM NH₄Cl

8 mM MgCl₂

2 mM Dithiothreitol

2 mM GTP

Jeder Ansatz enthielt 16 mMol ApUpG, 25 bis 30 pMol ribosomale 30S- bzw. 50S-Untereinheiten, 10 bis 20 µl einer Präparation von Initiationsfaktoren aus E.coli und unterschiedliche Mengen (¹⁴C)fMet-tRNS^{Met}. Nach Zusammengeben der Komponenten bei 0°C wurde 10 Minuten bei 30°C inkubiert. Dann wurde mit 500 µl eiskaltem Waschpuffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM NH₄Cl, 10 mM MgCl₂, pH 7,5) verdünnt und durch Millipore-Filter filtriert. Die Filter wurden zweimal mit je 5 ml Waschpuffer gewaschen und unter Infrarotlicht getrocknet. Die gebundene Radioaktivität wurde in 5 ml einer Toluol-Szintillationslösung (1g Dimethyl-POPOP, 17,5 g PPO, Toluol ad 2,5 l) gemessen.

2.2.7. Hydrolyse der Aminoacyl-esterbindung von Met-tRNS^{Met}

2.2.7.1. Hydrolyse der Aminoacyl-esterbindung von

2-Naphthoxyacetyl-(¹⁴C)Met-tRNS^{Met}

Die derivatisierte Met-tRNS^{Met} wurde in 1,8 M Tris-HCl, pH 8,2 zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt (55) und

dann mit zwei Volumen Äthanol (-30°C) gefällt, nachdem mit Eisessig auf pH 5 eingestellt worden war.

2.2.7.2. Hydrolyse der Aminoacyl-esterbindungen von fMet-tRNS^{Met}

fMet-tRNS^{Met} wurde in 0,2 M Ammoniumcarbonat, pH 9, 1 Stunde bei 37°C inkubiert und dann lyophilisiert.

2.2.7.3. Bestimmung der Halbwertzeiten der Aminoacyl- esterbindungen bei alkalischer Hydrolyse

In Ansätzen von 120 μl wurden die tRNS^{Met}- Einzelspezies mit (^{14}C)Methionin (260 Ci/Mol) aminoacyliert. Nach 15 Minuten wurde die Reaktion durch Abkühlen auf 0°C und Zugabe von 20 μl 0,6 M Na-Acetat, pH 5, beendet. Die einzelnen Ansätze wurden zur Entfernung des Proteins phenol-extrahiert und die wäßrigen Phasen schließlich viermal mit peroxidfreiem Äther ausgeschüttelt. Nach 1 Minute Präinkubation bei 37°C wurde zu jeder Probe das gleiche Volumen 1 M Tris-HCl, pH 9, das auf 37°C vorgewärmt war, gegeben. In Abständen von 1 Minute wurden nun 20 μl -Anteile entnommen und, wie unter 2.2.2.1. beschrieben, behandelt und ausgewertet.

Die Regressionsgeraden für die Wertepaare wurden nach der "Methode der kleinsten Quadrate" berechnet.

2.2.8. Präparation von Enzymen

2.2.8.1. Präparation eines L-Aminosäure:trNS-Ligase (AMP) enthaltenden Rohextrakts

Bei -30°C gelagerte Hühnerembryonenrumpfe wurden pulverisiert (siehe 2.2.1.) und dann in der anderthalbfachen Menge Standardpuffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM Mg-Acetat, 60 mM KCl, 6 mM 2-Mercaptoäthanol, pH 7,8) aufgenommen. Aus diesem Homogenat wurden Kerne und Zellbruchstücke abzentrifugiert und Ribonucleoproteine durch eine 0,1 M BaCl_2 -Fällung abgetrennt. Restliches BaCl_2 wurde durch eine 0,1 M Ammoniumsulfatfällung entfernt. Durch Zugabe von Ammoniumsulfat bis 80 % Sättigung wurden die Proteine ausgefällt und abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in Tris-Sulfat-Puffer (50 mM Tris- SO_4 , 1 mM EDTA, 2 mM 2-Mercaptoäthanol, pH 7,5) gelöst und über Sephadex G-25 in Tris-Sulfat-Puffer chromatographiert. In den einzelnen Fraktionen wurde die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen. Die Fraktionen mit $E_{280} > E_{260}$ wurden vereinigt und die Proteine durch Ammoniumsulfatfällung (80 % Sättigung) gewonnen. Das Präzipitat wurde in Phosphat-Puffer (20 mM KH_2PO_4 , 10 mM 2-Mercaptoäthanol, 0,1 mM EDTA, 10 % Glycerin, pH 7) resuspendiert und ausgiebig gegen den gleichen Puffer dialysiert. Unlösliches wurde abzentrifugiert und die Proteinlösung nach Erhöhung der Glycerinkonzentration auf 40 % in kleinen Portionen bei -30°C eingefroren.

2.2.8.2. Präparation einer für L-Methionin:tRNS-

Ligase(AMP) angereicherten Fraktion

L-Methionin:tRNS-Ligase(AMP) wurde durch differentielle Ammoniumsulfatfällungen und Chromatographie an DEAE-Cellulose aus dem Gewebehomogenat angereichert, das bis zur 0,1 M Ammoniumsulfatfällung behandelt wurde, wie unter 2.2.8.1. beschrieben. Bei den folgenden differentiellen Fällungen enthielt die Fraktion zwischen 15 und 25 % Ammoniumsulfat (g/ml) den überwiegenden Anteil der methioninspezifischen Ligasen. Die DEAE-Cellulose-Säule wurde mit einem linearen KCl-Gradienten (10 bis 30 mM) in 10 mM Phosphat-Puffer eluiert. Unter diesen Bedingungen wurde die Ligase in zwei Verteilungen desorbiert. Die entsprechenden Fraktionen der beiden Aktivitätsverteilungen wurden vereinigt. Die Proteine wurden gefällt und nach Dialyse in 10 mM Phosphat-Puffer mit 40 % Glycerin in kleinen Portionen bei - 30°C aufbewahrt.

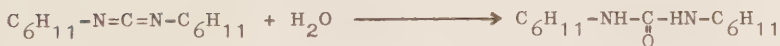
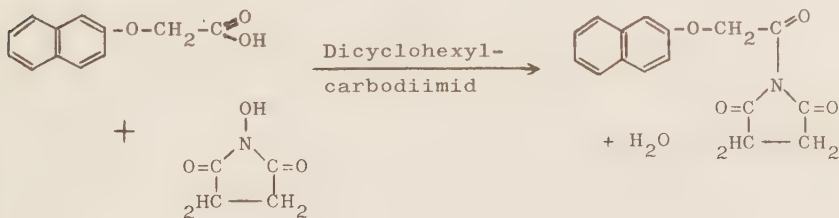
2.2.8.3. Präparation eines Enzymrohextrakts aus E.coli

25 g Zellen von E.coli A/9 wurden mit 50 g Aluminiumoxid verrieben, in 100 ml Standardpuffer (siehe 2.2.8.1.) aufgenommen und mit 0,125 ml Desoxyribonuclease I (1mg/ml) versetzt. Aluminiumoxid wurde durch wiederholtes Zentrifugieren entfernt und der Überstand dann in einer präparativen Beckman Ultrazentrifuge 2 Stunden bei 100 000 x g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde nach den unter

2.2.8.1. beschriebenen Fällungen zur weiteren Abtrennung von Nucleinsäuren über DEAE-Cellulose chromatographiert. Durch Stufenelution wurde die Hauptmenge des Proteins mit 0,5 M KCl in Standardpuffer desorbiert. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und weiter behandelt, wie unter 2.2.8.1. beschrieben.

2.2.9. Synthese des 2-Naphthoxyacetylesters von N-Hydroxysuccinimid

Die Synthese des 2-Naphthoxyacetylesters von N-Hydroxysuccinimid erfolgte nach der Carbodiimid-Methode (56). Die in dem folgenden Formelschema zusammengefaßten Reaktionen verlaufen über die von Khorana (57) im einzelnen beschriebenen Mechanismen.



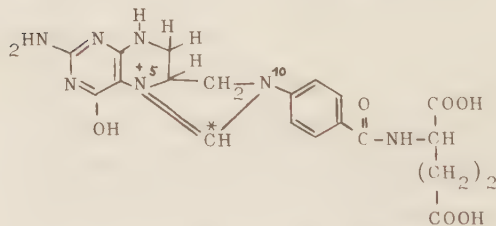
Nach der Vorschrift von Anderson et al. (58) wurden 4,04 g (20 mMol) 2-Naphthoxyessigsäure und 2,3 g (20 mMol) N-Hydroxysuccinimid in 80 ml wasserfreiem Dioxan gelöst, in einen 100 ml-Erlenmeyerkolben filtriert und mit 4,2 g (20 mMol)

Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Dieser Ansatz wurde sofort kräftig geschüttelt und unter wiederholtem Schütteln verschlossen stehen gelassen. Nach 2 Stunden wurden die spontan gebildeten grünlich-weißen Kristalle (Dicyclohexylharnstoff) abfiltriert, zweimal mit je 8 ml Dioxan gewaschen und verworfen. Die vereinigten Filtrate wurden im Rotationsverdampfer bei 25°C zu einem tiefschwarzen Sirup eingeeengt. Daraus wurde der Ester mit 10 ml 1-Propanol ausgefällt, unter Vakuum getrocknet und zweimal aus heißem 1-Propanol umkristallisiert. Die Ausbeute nach der ersten Kristallisation betrug 4,85 g (= 76 % der Theorie).

2.2.10. Synthese von



Der Synthese von $N^5, N^{10}-(^{14}C)\text{Methenyltetrahydrofolat}$



lag die Vorschrift von Huennekens et al. (59) zugrunde, die, wie im einzelnen ausgeführt, verändert wurde.

0,15 ml (^{14}C)Formaldehyd (1 mCi, 44 Ci/Mol) wurden mit Wasser auf 1 ml verdünnt und mit 10 mg dl,L-Tetrahydro-

folsäure (aus einer unter N_2 -Einstrom frisch geöffneten Ampulle) versetzt. Dieser Reaktionsansatz wurde zur Lösung der Tetrahydrofolsäure durch Zugabe von 4 Tropfen 0,1 N NaOH auf pH 6 gebracht und unter N_2 -Atmosphäre 5 Minuten bei $37^\circ C$ geschüttelt. Während der durch kontinuierliches Lösen der Tetrahydrofolsäure sinkende pH-Wert alle 5 Minuten mit 1-2 Tropfen 0,1 N NaOH korrigiert werden mußte, wurde weitere 10 Minuten bei $50^\circ C$ geschüttelt, bis sich die Tetrahydrofolsäure völlig gelöst hatte. Nach insgesamt 20 Minuten wurde der Reaktionsansatz mit 0,5 ml Elutionspuffer (0,1 M Ameisensäure, 10 mM 2-Mercaptoäthanol, 40 % Äthanol, pH 2,6) versetzt und in einem Volumen von ca. 3 ml auf eine mit Elutionspuffer äquilibrierte Cellulose-Säule (1 x 10 cm) aufgetragen. Die verwendete Cellulose war vorbehandelt, wie von Campbell et al. (60) beschrieben. Das Eluat wurde in 1 ml-Fractionen aufgefangen. Von 1 μ l jeder Fraktion wurde die Radioaktivität in 5 ml Bray's Lösung (61) bestimmt. Nach Identifizierung der Elutionsposition des $N^5, N^{10}-(^{14}C)$ Methenyltetrahydrofolats durch Dünnschichtchromatographie und Absorptionsspektrophotometrie wurden die entsprechenden Fraktionen vereinigt und lyophilisiert. $N^5, N^{10}-(^{14}C)$ Methenyltetrahydrofolat wurde in 200 μ l 50 mM Ameisensäure, 5 mM 2-Mercaptoäthanol zu einer Konzentration von 1,8 mM gelöst und in kleinen Portionen bei $-30^\circ C$ aufbewahrt. Von der Cellulose-Säule wurden 67 % der anfänglich einge-

setzten Radioaktivität zurückgewonnen.

2.2.11. Chromatographieverfahren

2.2.11.1. Chromatographie an BD-Cellulose

Die Chromatographie an BD-Cellulose bei Raumtemperatur wurde durchgeführt, wie von Gillam et al. (62) beschrieben. Vor Packen der Säulen wurde die BD-Cellulose (0,6 g Feuchtgewicht pro ml Füllvolumen)wiederholt in 2 M NaCl geschlämmt und durch Absaugen des langsamer absetzenden Materials weitgehend von feinen Schwebepartikeln befreit. So konnte eine gute Durchflußgeschwindigkeit der Säulen erreicht werden. Da bei längerem Behandeln mit Alkohol durch Umesterung die entsprechenden Benzoessäureester entstehen, wurde BD-Cellulose nicht wieder verwendet, wenn sie längere Zeit äthanolhaltigen Puffern ausgesetzt war. Für die erste Chromatographie einer Gesamt-tRNS-Präparation mußte erfahrungsgemäß zweimal mehr BD-Cellulose verwendet werden, als von Gillam et al. beschrieben, wahrscheinlich bedingt durch Begleitmaterial in der Präparation, das kein UV-Licht absorbiert.

In den einzelnen Fraktionen wurde die Absorption des eluierten Materials bei 260 nm gemessen und die Aminosäure-Akzeptorkapazität in aliquoten Anteilen bestimmt. Nach Vereinigung der entsprechenden Fraktionen wurde das Material durch Alkoholfällung konzentriert, der Niederschlag gelöst und gegen Wasser oder, falls erforderlich,

gegen Puffer dialysiert.

2.2.11.2. Reversed-Phase-5-Chromatographie

Das Reversed-Phase-5-Harz wurde nach Methode C von Pearson et al. (63) hergestellt, wie bereits beschrieben (64).

Das in Tris-Puffer (10 mM Tris-HCl, 0,4 M NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 2 mM 2-Mercaptoäthanol, pH 7 bei 23°C) geschlämmte Harz wurde mit einer Pasteurpipette portionsweise in die zur Hälfte mit Tris-Puffer gefüllte Säule gegeben und jeweils unter zunehmendem Druck zusammengepresst (bis zu 30 kp/cm²). Zwischen zwei Chromatographieläufen wurde die Säule bei gleicher Temperatur und unter gleichem Druck belassen.

Ein Schema der Versuchsanordnung ist in Abb. 1 dargestellt. Die über eine Schablone vorgegebene Gradientenform wurde durch einen elektronischen Gradientenformer (LKB 11 3000 Ultrograd, LKB-Produkte AB, Bromma, Schweden) abgetastet, der ein Mischventil steuert.

Die Hochdruckpumpe (Instrument Minipump Simplex 196-31 der Firma Dosapro Milton Roy) war zusätzlich mit einem Entlüftungskopf (Bleeder Valve V 4A der Firma Kontron Technik GmbH, Edung) versehen.

Die einzelnen Chromatographieschritte wurden über ein Motorventil (Doppel-6fach-Ventil PVC von Kontron) gesteuert.

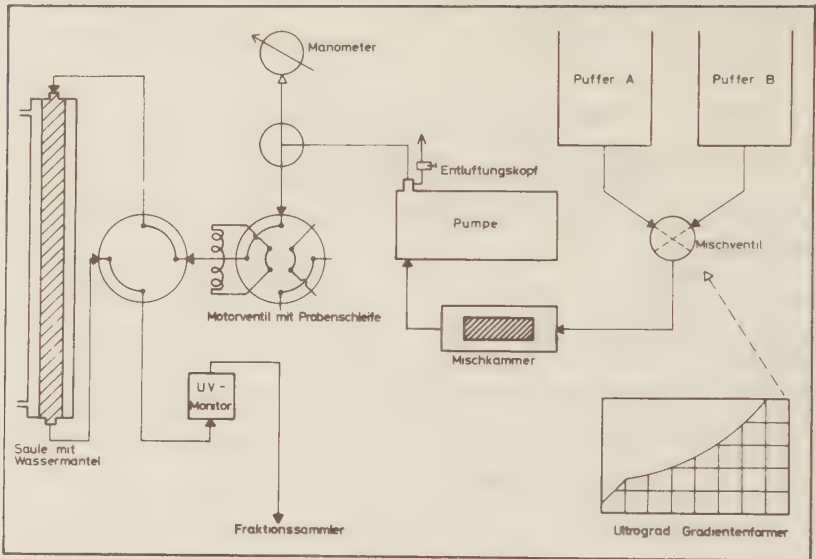


Abb.1 Schematische Darstellung der Versuchsanlage für Reversed-Phase-5-Chromatographie.

Es wurde eine Hochdrucksäule (Kontron) mit verstellbarem Bettvolumen (0,45 x 70 cm) verwendet. Die Säulentemperatur wurde durch einen Thermostaten der Firma Haake, Berlin, bei $32^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ konstant gehalten. In den LKB UV-Monitor war eine turbulenzfreie Durchflußzelle mit 4 mm Lichtweg eingebaut (International Equipment Company, Needham Heights, Mass. USA).

Mit einem Arbeitsdruck von $10-11 \text{ kp/cm}^2$ wurde eine Durchflußgeschwindigkeit von 0,25-0,3 ml/min erreicht. Der Gradient wurde in 8 Stunden entwickelt; in dieser Zeit ergab sich ein Gradientenvolumen von durchschnittlich 130 ml.

2.2.11.3. Papierchromatographie

Zur papierchromatischen Identifizierung von (^{14}C)Formylmethionin (aus (^{14}C)fMet-tRNS^{Met}, siehe 2.2.7.2.) und zur Reinheitsüberprüfung von (^{14}C)Methionin wurden neben 2 μl Methionin (25 $\mu\text{Mol/ml}$) mindestens 5000cpm (^{14}C)Methionin bzw. (^{14}C)Formylmethionin als Referenzen in der Startlinie aufgetragen. In einer mit Fließmittel gesättigten Atmosphäre wurde 8-10 Stunden bis zu einer Laufstrecke von ca. 35 cm in n-Butanol/Essigsäure/Wasser (60:15:25,v/v) auf Whatman 3 MM-Papier absteigend chromatographiert. Die Chromatogramme wurden in einem Berthold-Dünnschichtscanner ausgewertet. Die Position des nicht radioaktiven Methionins konnte durch die Ninhydrin-Reaktion sichtbar gemacht werden.

2.2.12. Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Es wurden Gele aus 16 % Acrylamid und 1,3 % Methylenbisacrylamid mit 7 M Harnstoff in 0,18 M HCl und 0,486 M Tris, pH 8,9, verwendet. Der Elektrodenpuffer bestand aus 30 mM Diäthylbarbitursäure und 3,3 mM Tris-HCl, pH 7,2 (65). Die Herstellung der Gele und die Durchführung der Elektrophorese erfolgten, wie bei Reuter (66) im einzelnen beschrieben. Sofort nach Elektrophorese wurde die Absorption bei 280 nm entlang der Gele in einem Gilford 2400-S Spektrophotometer gemessen.

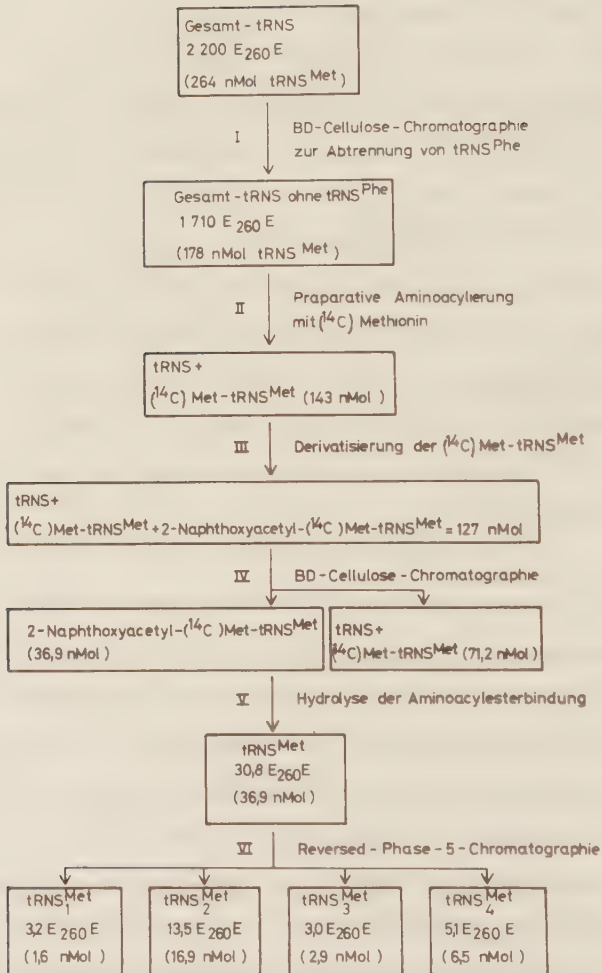


Abb.2 Schema zur Reinigung der vier tRNA^{Met} - Einzelspezies

3. Ergebnisse

3.1. Reinigung der vier tRNA^{Met}- Einzelspezies

Die Reinigung der methioninspezifischen tRNA aus der Muskulatur 13 Tage alter Hühnerembryonen, wie sie in der vorliegenden Arbeit geplant und durchgeführt wurde, gelang über den in Abb.2 im einzelnen dargestellten Weg. Die methioninspezifische tRNA konnte als hydrophobes Derivat der Met-tRNA^{Met} durch BD-Cellulose-Chromatographie abgetrennt werden. Die vier tRNA^{Met}- Einzelspezies wurden aus der gereinigten tRNA^{Met}- Fraktion durch Reversed-Phase-5-Chromatographie gewonnen.

3.1.1. Herstellung einer Gesamt-tRNA-Präparation und Abtrennung von tRNA^{Phe}

Bei der Herstellung des tRNA-Ausgangsmaterials wurden aus 600 g Gewebe (300 Embryonen) 110mg tRNA erhalten. 100 mg dieser tRNA (2200 E_{260nm}-Einheiten) mit einer Methionin-Akzeptorkapazität von 120 pMol/E_{260nm}-Einheit wurden für die Reinigung der tRNA^{Met} eingesetzt. Bei dem vorgesehenen Reinigungsgang, in dem die Eigenschaft von BD-Cellulose genutzt wird, hydrophobes Material stark zu binden, dürfen im tRNA-Ausgangsmaterial nicht von vornherein stark hydrophobe Polynucleotide enthalten sein. Diese würden bei der Chromatographie an BD-Cellulose (Abb.2,IV) mit der hydrophob derivatisierten Met-tRNA^{Met} zusammen eluiert werden und sie verunreinigen. Die phenyl-

alaninspezifische tRNS aus Hühnerembryonenumskulatur ist, wie auch in anderen Eukaryonten, eine solche hydrophobe Nucleinsäure, da sie in der Position neben dem 3'-Ende des Anticodons eine hydrophobe, hochmodifizierte Purinbase (Y^+ -Base) besitzt (67). Deshalb wurde im ersten Reinigungsschritt tRNS^{Phe} von Gesamt-tRNS durch Chromatographie

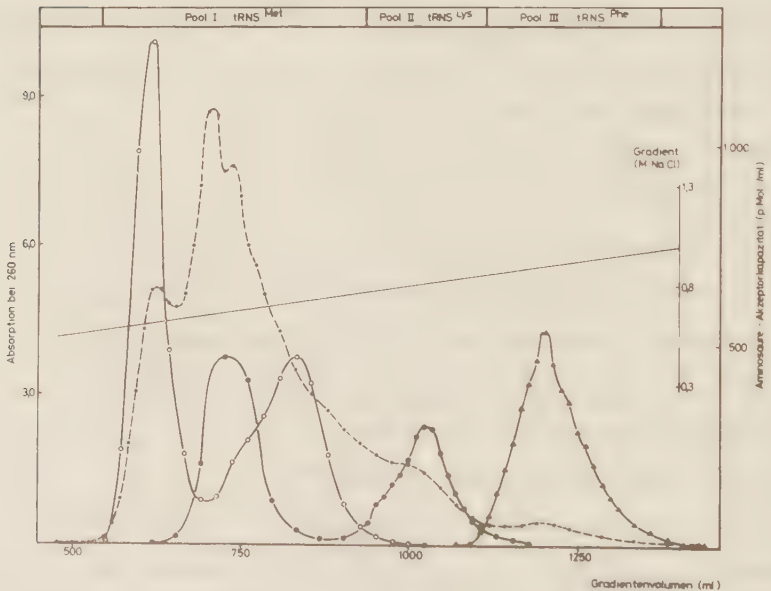


Abb.3 BD-Cellulose-Chromatographie zur Abtrennung der tRNS^{Phe} von Gesamt-tRNS.

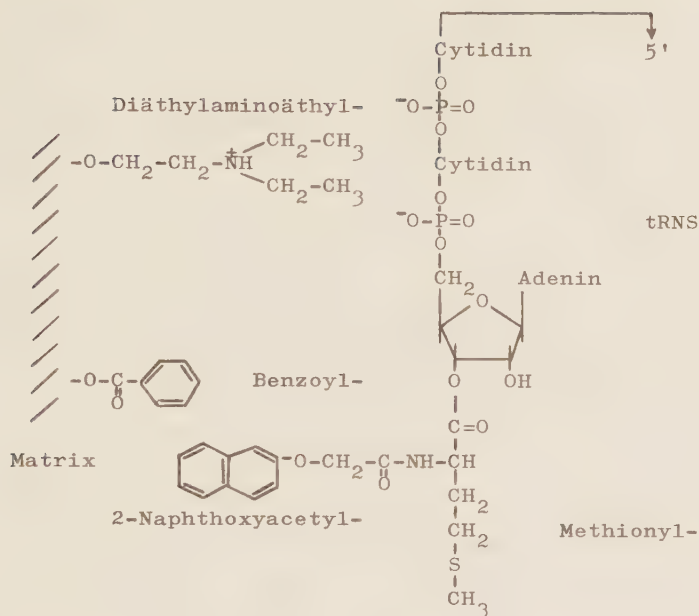
Der Elutionspuffer enthielt 0,3 M bzw. 1,3 M NaCl, 10 mM MgCl_2 und 10 mM Na-Acetat, pH 4,5. (●--●) $\text{E}_{260\text{nm}}$, (○—○) Methionin-Akzeptorkapazität, (●—●) Lysin-Akzeptorkapazität, (Δ—Δ) Phenylalanin-Akzeptorkapazität.

an BD-Cellulose abgetrennt (Abb.2,I). Wie Abb.3 zeigt, wurde dabei tRNS^{Met} durch einen linearen NaCl-Konzentrationsgradienten mit der Hauptmenge des Materials in zwei Verteilungen eluiert. Diese Elutionsweise gestattete die Isolation der hochgereinigten tRNS^{Phe} und einer an tRNS^{Lys} angereicherten Fraktion für andere Untersuchungen und damit die Abtrennung von ca. 14 % für Methionin nicht spezifischem Material. Von der BD-Cellulose-Säule (3 x 90 cm) wurden 88 % des UV-Licht absorbierenden Materials wiedergewonnen, davon 86 % in Pool I mit 1710 E_{260nm}-Einheiten und 178 nMol Methionin-Akzeptorkapazität.

3.1.2. Abtrennung der methioninspezifischen tRNS von übriger tRNS

Um eine Klasse isoakzeptierender tRNS von aller übrigen tRNS chromatographisch abtrennen zu können, müssen zwischen der zu isolierenden tRNS-Art und allen anderen tRNS-Arten Unterschiede produziert werden, welche die Spezifität und Effektivität der Reinigung dieser tRNS-Art im Chromatographieverfahren gewährleisten. Die Spezifität für eine tRNS-Art ist durch die von der entsprechenden L-Aminosäure:tRNS-Ligase(AMP) katalysierte Aminoacylierungsreaktion gegeben. Zur Herstellung eines chromatographisch effektiv nutzbaren chemischen Unterschieds am tRNS-Molekül wurden zwei Möglichkeiten erwogen. Durch die spezifische Aminoacylierung einer tRNS kann die

cis-Diol-Funktion ihres 3'-terminalen Adenosins gegen Perjodatoxidation geschützt werden. Alle andere tRNS ist dieser Oxidation zum Dialdehyd zugänglich (68,69). Die oxidierte, nicht spezifische tRNS und die aminoacylierten tRNS-Spezies können schließlich durch geeignete Chromatographieverfahren voneinander getrennt werden. Da bei diesem Vorgehen der größte Teil der tRNS-Präparation seine biologische Aktivität verliert, wird mit der hier zugrundegelegten Methode, die von Gillam et al. (53) entwickelt wurde, ein vorteilhafterer Weg eingeschlagen: die Aminoacyl-tRNS wird chemisch derivatisiert, während freie tRNS unverändert bleibt. An die α -Aminogruppe des veresterten Methionins wird der große aromatische 2-Naphthoxyacetylrest gekoppelt, der mit den aromatischen Benzoylgruppen von BD-Cellulose in Interaktion treten kann und so die Abtrennung der 2-Naphthoxyacetyl-Met-tRNS^{Met} von übriger tRNS möglich macht. Das folgende Formelschema (S.41) zeigt, wie über die Ionenbeziehungen zwischen den kationischen Diäthylaminoäthylgruppen der Cellulose und dem Phosphatpolyanion tRNS hinaus Affinitäten der Benzoylgruppen gegenüber dem aromatischen 2-Naphthoxyacetylsubstituenten an der Met-tRNS^{Met} wirksam werden. Zur Desorption der so gebundenen derivatisierten Met-tRNS^{Met} sind höhere Salzkonzentrationen unter Zusatz des schwach polaren Äthanol notwendig, während die nicht aminoacylierte und folglich nicht derivatisierte tRNS



hauptsächlich durch die Ionenaustauschwirkung mit mittleren Salzkonzentrationen desorbiert werden kann.

3.1.2.1. Vorversuche zur Aminoacylierung

Um in der Aminoacylierungsreaktion die maximale Beladung der tRNS^{Met} mit Methionin in kürzester Zeit zu gewährleisten, mußten die Reaktionsbedingungen für die Aktivität der L-Methionin:tRNS-Ligase(AMP) optimiert werden (70). Bei nicht limitierenden Substratkonzentrationen (tRNS und Methionin) wurde die Aktivität der Ligase in Abhängigkeit vom pH-Wert und vom Mg^{2+} /ATP-Konzentrationsverhältnis in Einzelkinetiken bestimmt. Die in Abb.4

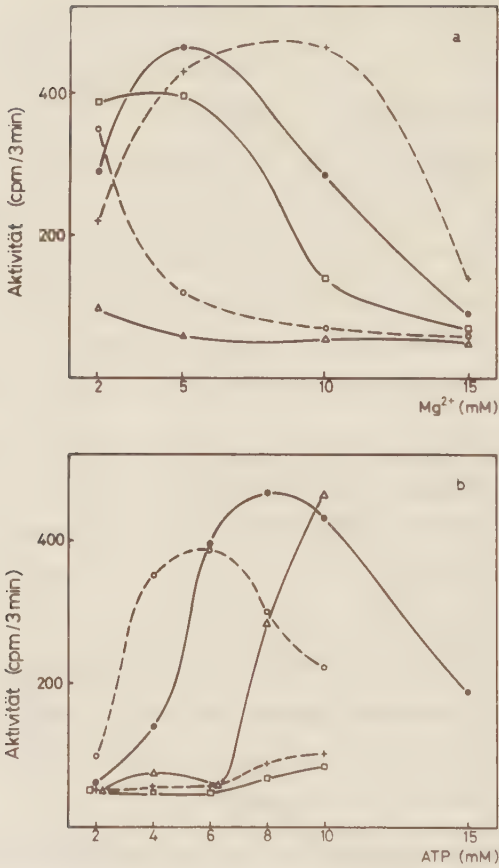


Abb. 4 Abhängigkeit der Aktivität der L-Methionin:trNS-Ligase(AMP) vom Mg^{2+} /ATP-Konzentrationsverhältnis.

a) ($\Delta-\Delta$) 2 mM ATP, ($o-o-o$) 4 mM ATP, ($\square-\square$) 6 mM ATP, ($\bullet-\bullet$) 8 mM ATP, ($+--+$) 10 mM ATP. b) ($o-o-o$) 2 mM Mg^{2+} , ($\bullet-\bullet$) 5 mM Mg^{2+} , ($\Delta-\Delta$) 10 mM Mg^{2+} , ($+--+$) 15 mM Mg^{2+} , ($\square-\square$) 20 mM Mg^{2+} . Alle Zeitabhängigkeiten verliefen bis 7 Minuten linear. Ein durchschnittlicher Hintergrundwert von 18 cpm wurde berücksichtigt.

dargestellten Experimente ergaben die optimalen Konzentrationen von 5 mM Mg^{2+} und 8 mM ATP. Hinsichtlich der Abhängigkeit vom pH-Wert war die Reaktion um pH 8,2 optimiert.

3.1.2.2. Vorversuche zur Derivatisierung

Für die Substitutionsreaktion an der α -Aminogruppe der Aminosäuren sind die reaktiven Ester des N-Hydroxysuccinimids geeignet, die in der Peptidsynthese als Acyldonatoren Verwendung finden (58,71). Da die α -Aminogruppe nur in ihrer nicht protonierten Form dem elektrophilen Angriff des eingesetzten Reaktionspartners zugänglich ist, muß in der Nähe ihres pK-Wertes gearbeitet werden (für freies Methionin bei pH 9,2). Allerdings kann der pH-Wert nicht beliebig erhöht werden, da mit steigendem pH die Labilität der Aminoacylsterbindung zunimmt. Der reaktive Succinimidester wird der Reaktion in wasserfreiem Tetrahydrofuran zugeführt, da er in Wasser schlecht löslich ist und schnell hydrolysiert.

Bei einer Tetrahydrofuran-Endkonzentration von 29 %, die ausreichend ist, um genügend reaktiven Ester in Lösung zu bringen (64), wurden die Derivatisierungsrate einerseits und die Hydrolyse der Aminoacylsterbindung andererseits bei verschiedenen pH-Werten ermittelt. Tabelle 2 zeigt, daß bei pH 8,6 die höchste Derivatisierungsrate erreicht wurde und dabei noch keine Hydrolyse der Aminoacylster-

bindung zu verzeichnen war.

Tabelle 2 Derivatisierung der (^{14}C)Met-tRNS^{Met} in
Abhängigkeit vom pH-Wert.

pH	Derivatisierung (%)	Hydrolyse der Aminoacylsterbindung (%)
8,5	62	0
8,6	72	0
8,7	57	6,5
8,8	51	11
9,2	47	17

Die prozentuale Hydrolyse wurde aus der Menge der säurefällbaren Radioaktivität direkt vor und nach der Derivatisierungsreaktion ermittelt. Die prozentuale Derivatisierung stellt den Anteil der von einer kleinen BD-Cellulose-Säule eluierten Gesamtradioaktivität dar, der nur durch Äthanolzusatz zum Elutionspuffer desorbiert werden kann.

In diesen Vorversuchen wurden auch geeignete Elutionsbedingungen (NaCl- und Äthanolkonzentrationen des Puffers) ermittelt, welche die Abtrennung von allem anderen Material, aber auch die schnelle Desorption des Met-tRNS^{Met}-Derivats gewährleisten. Diese Bedingungen sind in Abb.5 angegeben.

3.1.2.3. Hauptversuch: Aminoacylierung, Derivatisierung und BD-Cellulose-Chromatographie

Wie in Abb.2,II angegeben, wurden 1710 E_{260nm} -Einheiten in einem Ansatz von 60 ml mit (^{14}C)Methionin (25 Ci/Mol) aminoacyliert. Die Ligasepräparation wurde bis unmittelbar vor der Reaktion ausgiebig dialysiert, um durch Proteolyse eventuell freigesetzte Aminosäuren zu entfernen, die ebenfalls an ihre tRNS verestert wurden. Damit wäre auch solche Aminoacyl-tRNS der nachfolgenden Derivatisierungsreaktion zugänglich, was letztlich zu einer Verunreinigung der tRNS^{Met} führen müßte. Von der innerhalb 15 Minuten aminoacylierten (^{14}C)Met-tRNS^{Met} konnten nach Entfernung der Proteine durch wiederholte Phenolbehandlung und nach Äthanol-fällung 71 % wiedergewonnen werden. Bei der anschließenden Derivatisierung ging keine säurefällbare Radioaktivität verloren.

Abb.5 zeigt die stufenweise Elution der tRNS und der 2-Naphthoxyacetyl-(^{14}C)Met-tRNS^{Met} von einer BD-Cellulose-Säule (3 x 90 cm). Zuerst wurde das bei der anfänglichen NaCl-Konzentration nicht gebundene ATP eluiert, das noch von der Aminoacylierungsreaktion stammte. Durch stufenweise Erhöhung der NaCl-Konzentration wurden die unbeladene tRNS und die nicht derivatisierte (^{14}C)Met-tRNS^{Met} mit 1 M NaCl eluiert; unspezifisches Material wurde mit 1 M NaCl/10 % Äthanol desorbiert. Die letzte Elutionsstufe (2 M NaCl/20 % Äthanol), in der die deri-

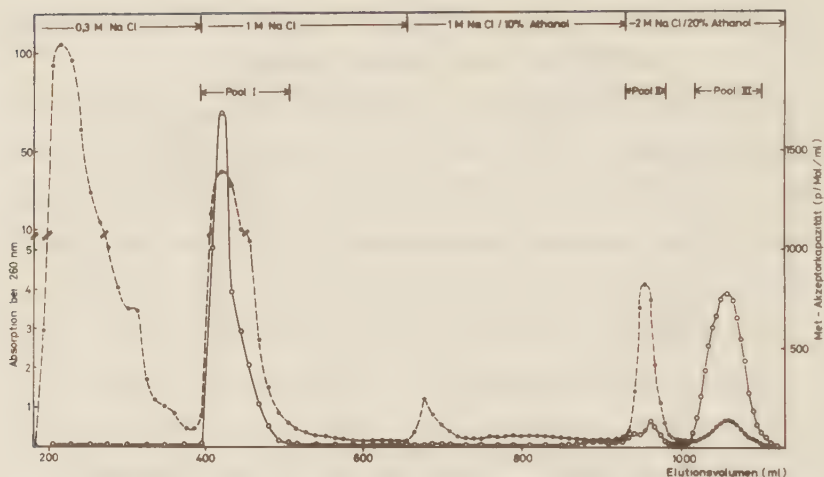


Abb.5 BD-Cellulose-Chromatographie zur Abtrennung von 2-Naphthoxyacetyl-(^{14}C)Met-tRNS^{Met}.

(●---●) $E_{260\text{nm}}$, (○---○) säurefällbare ^{14}C -Radioaktivität. Der Elutionspuffer enthielt 10 mM Na-Acetat, 10 mM MgCl_2 , pH 4,5, und die in der Abb. angegebenen NaCl- und Äthanolkonzentrationen.

vatisierte (^{14}C)Met-tRNS^{Met} desorbiert wird, ergab zwei Verteilungen. Das Material aus beiden Verteilungen wurde jeweils durch Äthanol-fällung konzentriert. Nach Hydrolyse der Aminoacyl-esterbindungen (Abb.2,V) wurden beide Fraktionen durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese charakterisiert. Das Material in Pool II bestand zum überwiegenden Anteil aus verschieden großen tRNS-Bruchstücken, die in der Elektrophorese weiter als unversehrte tRNS in einem breiten Bereich wandern (Abb.6a). Der größte Teil des

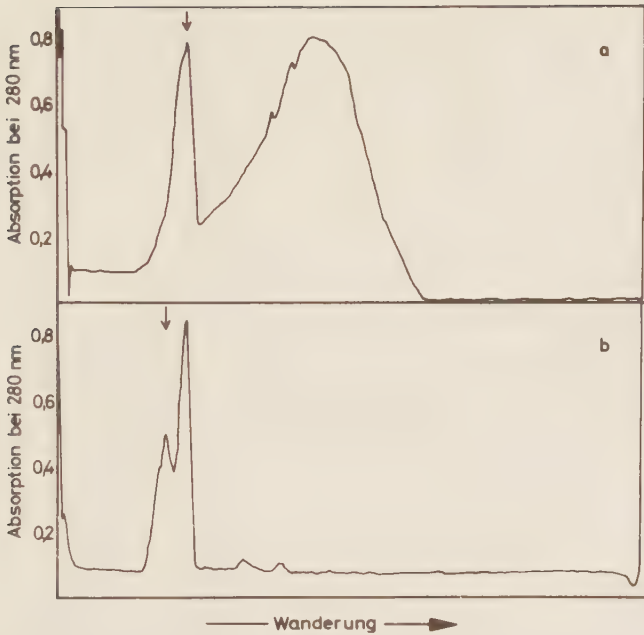


Abb.6 Diskelektrophorese des durch BD-Cellulose-Chromatographie (Abb.5) isolierten Materials in Polyacrylamidgelen mit 7 M Harnstoff.

a) Pool II, b) Pool III. Etwa 0,075 E_{260nm} -Einheiten wurden jeweils in die Elektrophorese eingesetzt. Die Pfeile bezeichnen in a) die Position von tRNS und in b) die Position höhermolekularer RNS.

Materials aus Pool III wandert in der Position von tRNS. Ein geringerer Anteil mit höherem Molekulargewicht als tRNS stellt wahrscheinlich die kleinste ribosomale RNS-Spezies dar (Abb.6b).

Von der BD-Cellulose-Säule wurden 80 % der eingesetzten

E_{260nm} -Einheiten wiedergewonnen. 35 % der Met-tRNS^{Met} waren derivatisiert worden. 31 E_{260nm} -Einheiten tRNS^{Met} mit einer Methionin-Akzeptorkapazität von 1200 pMol/ E_{260nm} -Einheit wurden aus Pool III isoliert.

3.1.3. Isolierung der tRNS^{Met}- Einzelspezies

Die Bedingungen der Reversed-Phase-5-Chromatographie für eine optimale Trennung der tRNS^{Met}- Einzelspezies wurden in eingehenden Vorversuchen ermittelt. Die Form des Salzgradienten, die mit dem elektronischen Gradientenformer beliebig eingestellt werden kann, wurde empirisch ermittelt. Dabei wurde von der Überlegung ausgegangen, daß die geringste Steigung des Gradienten in dem Bereich vorgegeben werden sollte, in dem die tRNS^{Met}- Spezies eluiert werden. Variierung der Gradientenvolumina und der Druck-und Durchflußgrößen ergab die unter 2.2.11.2. aufgeführten günstigen Trennbedingungen. Zur Auftrennung der Einzelspezies wurden 30 E_{260nm} -Einheiten tRNS^{Met} in die Reversed-Phase-5-Chromatographie eingesetzt (Abb.2,VI). Abb. 7b zeigt das Ergebnis dieser Trennung. Die Verteilung der Methionin-Akzeptorkapazität in den einzelnen Fraktionen stimmt in den Elutionspositionen und relativen Mengen mit denen im tRNS-Ausgangsmaterial überein, das unter gleichen Bedingungen chromatographiert wurde (Abb. 7a). Durch Vereinigung der jeweiligen Fraktionen der vier Verteilungen, Konzentrierung durch Gefriertrocknung und Äthanol-fällung

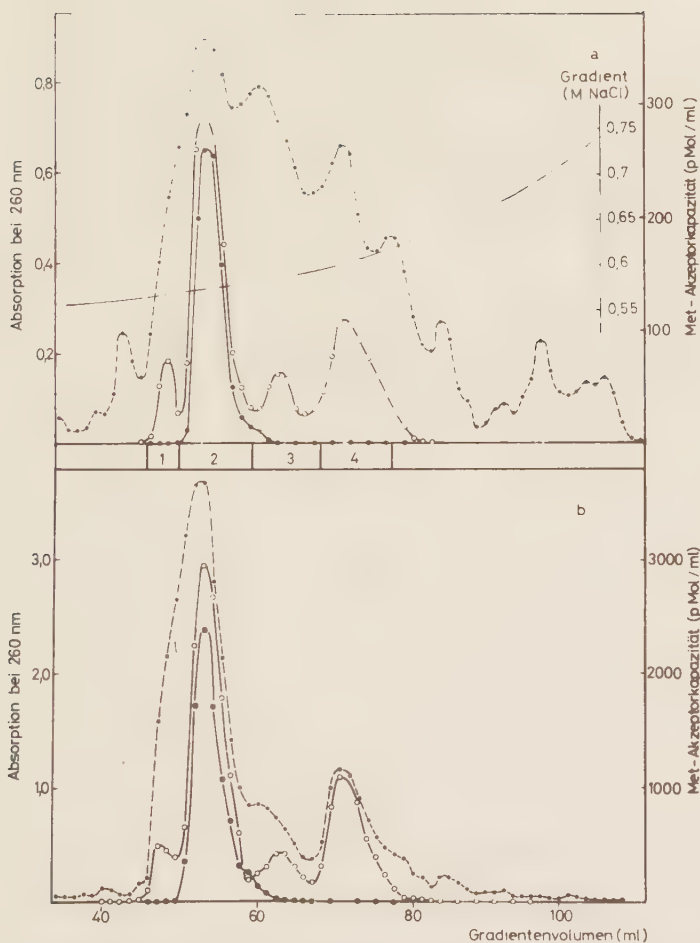


Abb. 7 Verteilung der $tRNA^{Met}$ -Spezies nach Reversed-Phase-5-Chromatographie.

a) Gesamt- $tRNA$ -Ausgangsmaterial, b) $tRNA^{Met}$. (●--●) E_{260nm} , (○--○) Methionin-Akzeptorkapazität nach Aminoacylierung durch die homologe Ligase, (●--●) Methionin-Akzeptorkapazität nach Aminoacylierung durch Ligase aus *E.coli*. Die bezifferten Blöcke markieren, welche Fraktionen zu Pools vereinigt wurden.

wurden die vier tRNA^{Met} -Einzelspezies gewonnen und ausgiebig gegen Wasser dialysiert. Die Ausbeuten und die spezifischen Methionin-Akzeptorkapazitäten sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3 Ausbeuten und Akzeptorkapazitäten
der tRNA^{Met} -Einzelspezies.

tRNA^{Met} - Spezies	$E_{260\text{nm}}$ - Einheiten	Met-Akzeptor- kapazität (pMol/ $E_{260\text{nm}}$ - Einheit)	pMol
1	3,2	490	1570
2	13,5	1250	16880
3	3,0	960	3000
4	5,1	1280	6530

3.2. Eigenschaften der tRNA^{Met} -Einzelspezies

3.2.1. Polyacrylamidgel-Elektrophorese

der tRNA^{Met} -Einzelspezies

Die nach Derivatisierung durch Chromatographie an BD-Cellulose gewonnene tRNA^{Met} , aus der die Einzelspezies isoliert wurden, zeigte in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese zwei Gipfel in den Positionen von tRNA und wahrscheinlich der kleinsten ribosomalen RNS (Abb.6b). Durch Elektrophorese der vier Einzelspezies sollte nun herausgefunden werden, ob das kontaminierende höhermolekulare

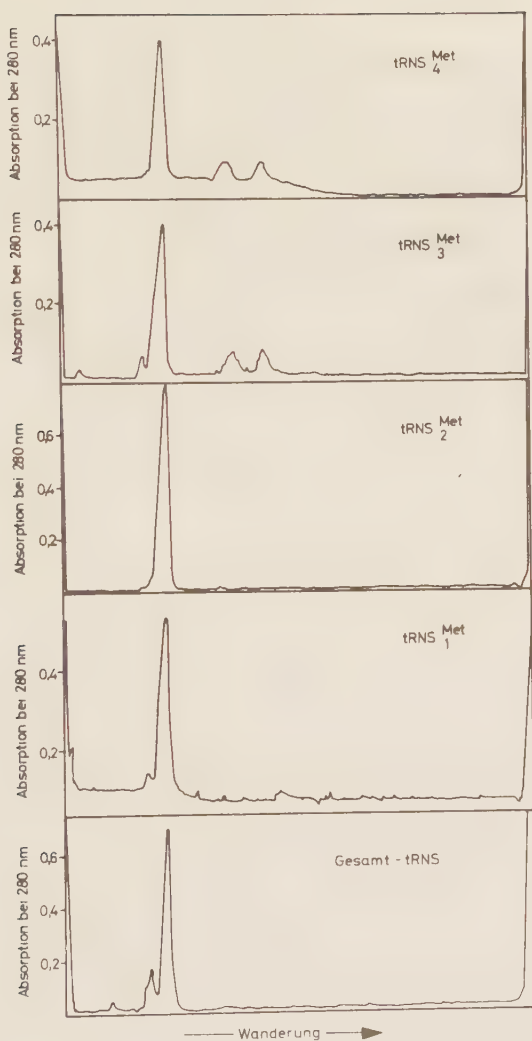


Abb. 8 Polyacrylamidgel-Diskelektrophorese der tRNA^{Met} -Einzelspezies und des tRNA-Ausgangsmaterials.

Auf jedes Gel wurden ca. 0,05 $\text{E}_{260\text{nm}}$ -Einheiten aufgetragen.

Material bei der Reversed-Phase-5-Chromatographie abgetrennt wurde. In Abb.8 sind die Absorptionsprofile entlang der Gele nach Elektrophorese jeder Spezies und des Gesamt-tRNS-Ausgangsmaterials wiedergegeben. Die Präparationen 1 und 3 enthalten noch Spuren (ca. 5 %) der Verunreinigung. In den Präparationen 3 und 4 können geringe Anteile weiter wandernder Degradationsprodukte nachgewiesen werden. Die Präparation 2 enthält reine tRNS.

3.2.2. Kontamination der vier tRNS^{Met}-Einzelspezies durch andere tRNS

Die isolierten tRNS^{Met}-Einzelspezies wurden auf Kontamination durch andere tRNS getestet. Wie unter 3.1.2.3. erwähnt, sind solche Verunreinigungen beim angewandten Reinigungsverfahren nicht auszuschließen, wenn im Aminoacylierungsansatz vor der Derivatisierung andere Aminosäuren außer (¹⁴C)Methionin vorhanden waren, z.B. aufgrund einer Proteaseaktivität freigesetzt wurden. Zum Nachweis fremder Aminosäure-Akzeptorkapazität wurde jede tRNS^{Met}-Spezies (0,03 E_{260nm}-Einheiten) mit vierzehn Aminosäuren hoher spezifischer Radioaktivität getestet. Da nicht die Anreicherung einer bestimmten aminosäurespezifischen tRNS angenommen werden mußte, wurde, um das isolierte Material sparsam zu verwenden, nicht jede Aminosäure einzeln in die Aminoacylierungsreaktion eingesetzt. Um jedoch auch geringe Verunreinigungen mit ausreichender

Tabelle 4 Kontamination der tRNS^{Met}- Spezies
durch andere tRNS.

Gruppe →	Aminosäure-Akzeptorkapazität (pMol/E _{260nm} - Einheit)						
		1	2	3	4	5	1-5
tRNS	Met	Gly Val Arg	Ala His Asn	Thr Gln	Asp Pro Lys	Ile Ser Glu	
Met ₁	490	58	0	0	0	18,5	76,5
Met ₂	1250	0	0	0	0	50,9	50,9
Met ₃	960	18,9	0	4	0	36,2	59,1
Met ₄	1280	0	0	8,5	0	3,9	12,4
Gesamt-tRNS	120	409	172	146	148	158	1033

Empfindlichkeit nachweisen zu können, wurden die Aminosäuren mit ähnlichen Optima des Mg^{2+} /ATP-Konzentrationsverhältnisses der entsprechenden Ligasen in fünf Gruppen zusammengefaßt. Wie aus Tabelle 4 hervorgeht, wird nur für die Aminosäuren aus Gruppe 5 in allen tRNS-Präparationen Akzeptorkapazität nachgewiesen. Dagegen werden Aminosäuren aus Gruppe 1 und 3 in jeweils zwei Präparationen akzeptiert, während für die Aminosäuren aus Gruppe 2 und 4 in keiner Präparation Akzeptorkapazität nachgewiesen werden kann. Bezogen auf die spezifische Methionin-Akzeptorkapazität ist die Akzeptorkapazität für andere Aminosäuren in der tRNS^{Met}₁- Spezies am größten, die gleichzeitig die gering-

ste spezifische Aktivität für Methionin besitzt. Die letzte Zeile in Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse eines Kontrollversuchs, in den 0,07 E_{260nm} -Einheiten tRNS-Ausgangsmaterial eingesetzt wurden.

3.2.3. Kontamination der Einzelspezies untereinander
Um beurteilen zu können, wie groß die Kontamination der Spezies untereinander ist und mit welcher Aussagekraft infolgedessen die auf diese Weise isolierten Spezies charakterisiert werden können, wurde die Qualität der Trennung der tRNS^{Met}-Einzelspezies voneinander durch Reversed-Phase-5-Chromatographie durch die zwei folgenden Experimente untersucht.

Die jeweiligen Fraktionen entsprechend den Verteilungen der Methionin-Akzeptorkapazität des in Abb.7a dargestellten Versuchs (Reversed-Phase-5-Chromatographie von Gesamt-tRNS) wurden zu drei getrennten Pools vereinigt: tRNS^{Met}₁ + tRNS^{Met}₄, tRNS^{Met}₂ und tRNS^{Met}₃. Diese Pools wurden einzeln an der gleichen Säule rechromatographiert. Die Fraktionen der Chromatographieläufe wurden mit hochmarkiertem (¹⁴C)-Methionin (260 Ci/Mol) auf ihre Methionin - Akzeptorkapazität getestet. Wie aus Abb.9 ersichtlich, sind die Verunreinigungen der Einzelspezies untereinander gering. Dieses Ergebnis rechtfertigt die Annahme, daß auch die nach Reversed-Phase-5-Chromatographie isolierten Einzelspezies gut voneinander getrennt sind. Zur Kontrolle

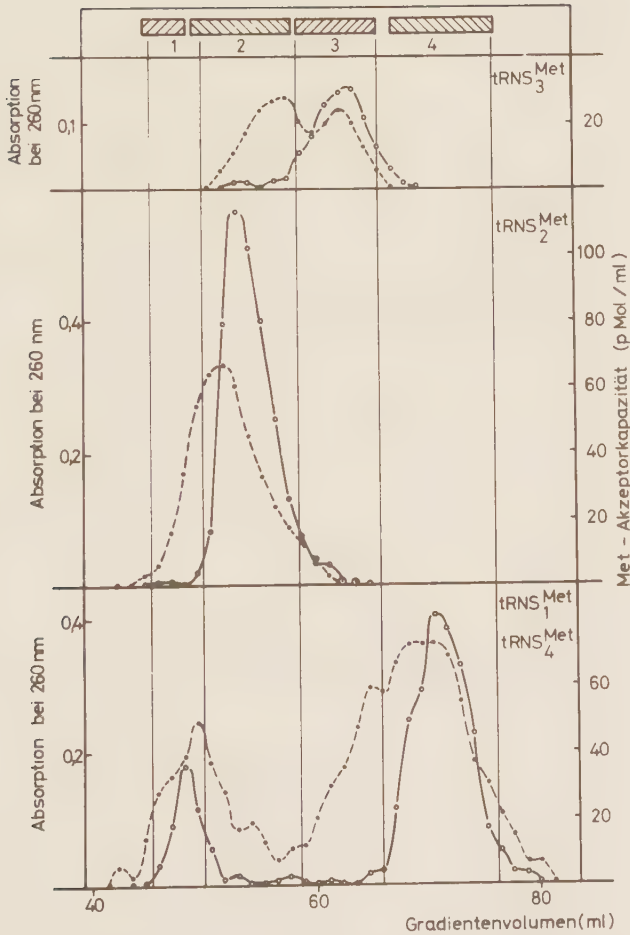
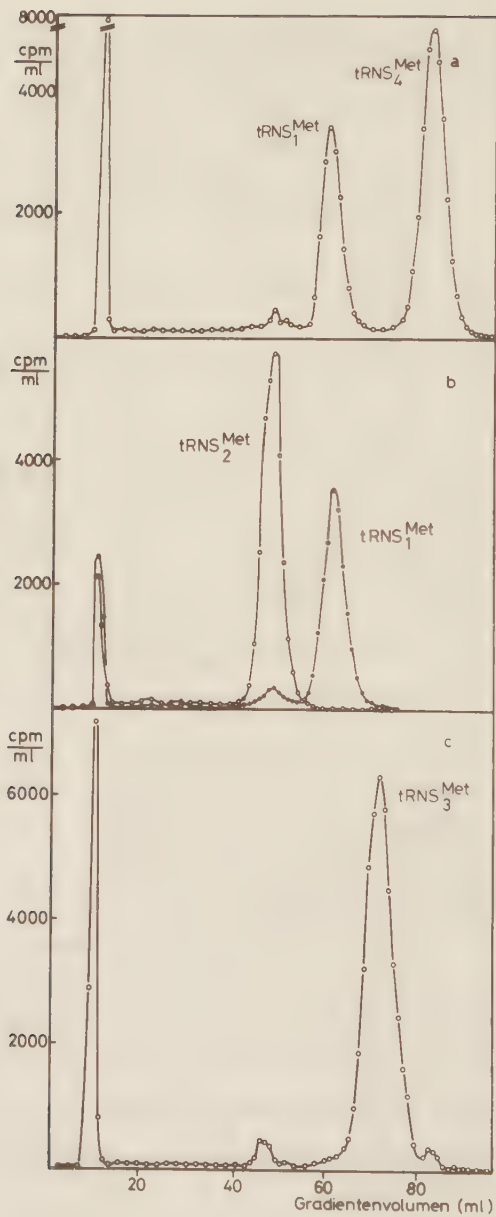


Abb.9 Wiederholung der Reversed-Phase-5-Chromatographie der $tRNA^{Met}$ enthaltenden Fraktionen, die entsprechend Abb.7a aus Gesamt-tRNA gewonnen wurden.

(●--●) E_{260nm} , (o—o) Methionin-Akzeptorkapazität. Die schraffierten Flächen kennzeichnen die Verteilung bei der ersten Chromatographie.



wurden dennoch in einem weiteren Versuch die isolierten Einzelspezies nach Aminoacylierung mit (^{14}C)Methionin durch Reversed-Phase-5-Chromatographie charakterisiert. Zur Stabilisierung der Aminoacylsterbindung wurde in Acetat-Puffer bei pH 4,5 chromatographiert. Aminoacylierte tRNS^{Met} wird bei pH 4,5 anders chromatographiert als nicht aminoacylierte: Spezies 1 und 2 erscheinen in umgekehrter Reihenfolge. Abb.10a zeigt die gemeinsame Chromatographie von (^{14}C)Met-tRNS $_1^{\text{Met}}$ und (^{14}C)Met-tRNS $_4^{\text{Met}}$. Im Experiment der Abb.10b wurden (^3H)Met-tRNS $_1^{\text{Met}}$ und (^{14}C)Met-tRNS $_2^{\text{Met}}$ zusammen chromatographiert. Durch Vergleich dieser beiden Abbildungen ergibt sich, daß Spezies 1 mit 6-7 % der Spezies 2 kontaminiert ist. Der Vergleich von Abb.10c (Chromatographie von (^{14}C)Met-tRNS $_3^{\text{Met}}$) mit Abb.10a und 10b zeigt, daß Spezies 3 mit etwa 3 % der Spezies 2 und etwa

Abb. 10 Reversed-Phase-5-Chromatographie der

Met-tRNS $^{\text{Met}}$ -Einzelspezies.

a) (^{14}C)Met-tRNS $_1^{\text{Met}}$ + (^{14}C)Met-tRNS $_4^{\text{Met}}$; b) (^3H)Met-tRNS $_1^{\text{Met}}$ + (^{14}C)Met-tRNS $_2^{\text{Met}}$; c) (^{14}C)Met-tRNS $_3^{\text{Met}}$. Der Puffer enthielt 0,4 bzw. 0,9 M NaCl, 10 mM Na-Acetat, 10 mM MgCl_2 , 2 mM 2-Mercaptoäthanol, pH 4,5. (o—o) ^{14}C -Radioaktivität, (●—●) ^3H -Radioaktivität. Die Radioaktivität wurde in 0,5 ml jeder Fraktion bestimmt. Im Doppelmarkierungsversuch (b) wurden für die Berechnung der ^3H - und ^{14}C -Radioaktivität die jeweiligen Zählausbeuten der beiden Radionuklide unter identischen Quenching-Bedingungen in beiden Kanälen des Geräts zugrunde gelegt.

2 % der Spezies 4 kontaminiert ist. Spezies 4 enthält keine Kontamination.

Die Wiedergewinnung der auf die Säule aufgetragenen Radioaktivität betrug durchschnittlich 86 %. Zwischen 7 und 15 % der Radioaktivität wurde infolge Hydrolyse der Aminoacyl-esterbindung in den ersten Fraktionen eluiert. Auch dieser Kontrollversuch zeigt eine fast vollständige Trennung der vier tRNS^{Met}- Spezies voneinander.

3.2.4. Bestimmung der Halbwertzeiten der Aminoacyl-esterbindungen bei alkalischer Hydrolyse

Die Stabilität der Aminoacyl-esterbindung einer Aminoacyl-tRNS ist unter gegebenen Bedingungen einerseits von der Natur der veresterten Aminosäure abhängig (72). Zum anderen beeinflußt die tRNS als zweiter Bestandteil des Esters grundsätzlich ebenfalls die Stabilität der Esterbindung. Dieser Einfluß könnte als der eines großen Polyanions in allen Aminoacyl-tRNS-Esterbindungen gleich sein. Unterschiedliche Basensequenzen in tRNS-Molekülen können jedoch über ihren Einfluß auf die Tertiärstruktur zu unterschiedlichen Ladungsmustern in der Nähe der Aminoacyl-esterbindung führen, die die Stabilität dieser Bindungen unterschiedlich beeinflussen. Diese Möglichkeit trifft auch für Sequenzunterschiede zwischen isoakzeptierenden tRNS-Spezies zu. Deshalb wurde untersucht, ob derartige Unterschiede zwischen den tRNS^{Met}- Spezies nachzuweisen

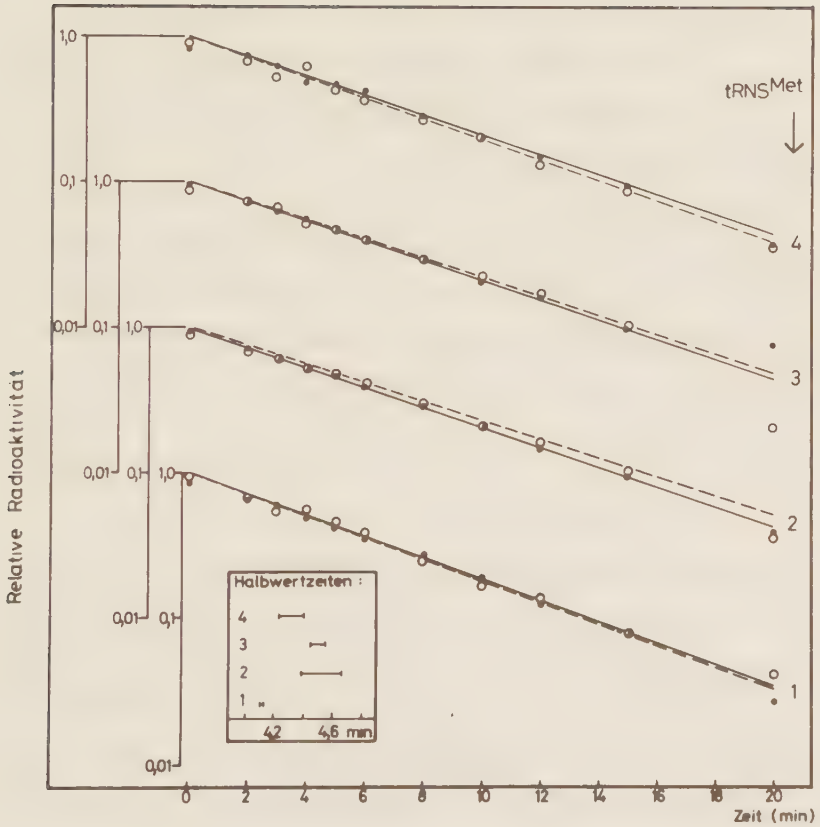


Abb. 11 Zeitabhängigkeiten der alkalischen Hydrolyse der Aminoacyl esterbindungen der vier Met-tRNS^{Met}- Einzelspezies.

(o---o) und (●---●) Regressiongeraden jeweils zweier Versuche (o) bzw. (●). Anfangsaktivitäten: 1 (281 cpm, 282 cpm); 2 (607 cpm, 478 cpm); 3 (415 cpm, 695 cpm); 4 (605 cpm, 261 cpm).

sind. Die vier (^{14}C)Met-tRNS^{Met}- Spezies wurden der alkalischen Hydrolyse unter identischen Bedingungen unterworfen. Die Halbwertzeiten wurden aus den Hydrolysekinetiken jeder aminoacylierten Spezies bestimmt. Die Werte der Kinetiken ergaben, halblogarithmisch aufgetragen, lineare Zeitabhängigkeiten, sodaß die Hydrolyse der Aminoacylbindung als geschwindigkeitsbestimmender Schritt angenommen werden konnte. In Abb.11 sind die Regressionsgeraden für die Kinetiken und die daraus errechneten Halbwertzeiten abgebildet. Die Halbwertzeiten liegen zwischen 4,1 und 4,6 Minuten, wobei der größte Unterschied zwischen tRNS₁^{Met} und tRNS₂^{Met} besteht.

3.2.5. Untersuchungen zur Frage nach der Initiatorspezies
Die vordringlichste Frage nach der Funktion der isoakzeptierenden tRNS^{Met}- Spezies ist die nach der Initiator-tRNS. Es ist bekannt (27), daß eukaryote Initiatorspezies als einzige unter den isoakzeptierenden tRNS^{Met}- Spezies durch L-Methionin:tRNS-Ligase(AMP) aus E.coli aminoacyliert werden. Außerdem können die aminoacylierten Initiatorspezies durch Methionyl-tRNS-Transformylase aus E.coli formyliert werden.

3.2.5.1. Heterologe Aminoacylierung

Nach der Trennung der tRNS^{Met}- Spezies voneinander durch Reversed-Phase-5-Chromatographie (Abb.7) wurde in jeder Fraktion die Methionin-Akzeptorkapazität auch mit Hilfe

eines Enzymrohextrakts aus E.coli bestimmt. Dabei zeigte sich für die tRNS^{Met} - Verteilung der Gesamt-tRNS (Abb.7a) und für die Einzelspezies (Abb.7b), daß nur $\text{tRNS}_2^{\text{Met}}$ heterolog aminoacyliert werden kann. In beiden Fällen wurde praktisch die gleiche spezifische Akzeptorkapazität wie mit homologem Enzym erreicht. Im Zusammenhang mit diesem Ergebnis ist der Befund interessant, der in dieser Arbeit nicht dargestellt ist, daß in Gesamt-tRNS aus 16 Tage alten Hühnerembryonen auch die $\text{tRNS}_1^{\text{Met}}$ im gleichen Ausmaß heterolog aminoacyliert werden kann.

3.2.5.2. Formylierung

Mit zwei unterschiedlichen Methoden wurde untersucht, welche der vier $\text{Met-tRNS}^{\text{Met}}$ - Einzelspezies der Formylierung durch Transformylase aus E.coli zugänglich sind. Zum einen wurden im Anschluß an die Reaktion die Deacylierungsprodukte chromatographisch analysiert. Aminoacylierung und Formylierung wurden in einem Ansatz durchgeführt. Um die Aminoacylierung jeder Spezies sicherzustellen, wurde ein Enzymgemisch aus Hühnerembryonemuskulatur und E.coli eingesetzt. Im Anschluß an die Reaktion und nach Deproteinierung wurden (^{14}C)Methionin bzw. N-Formyl-(^{14}C)Methionin von der tRNS alkalisch abgespalten und papierchromatographisch identifiziert. Die quantitative Auswertung der Chromatogramme ist in Abb.12 für die einzelnen Spezies dargestellt. Die angegebenen

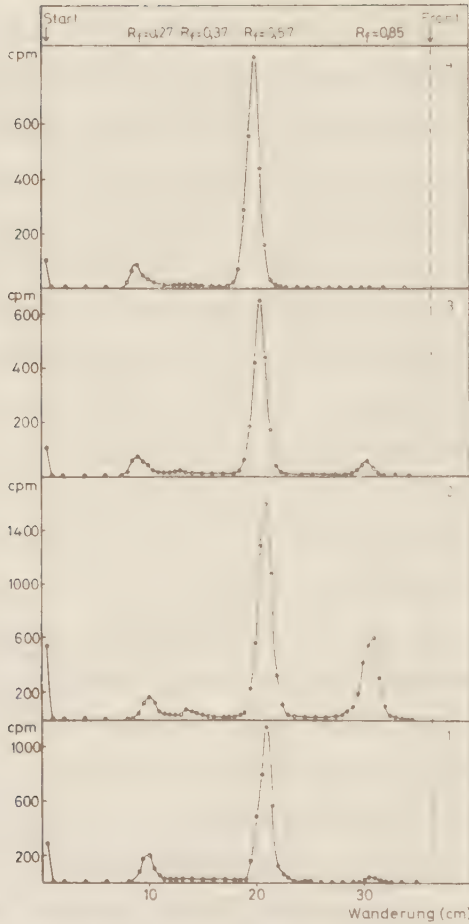


Abb.12 Papierchromatographie von Deacylierungsprodukten der vier tRNA^{Met} -Spezies nach Aminoacylierung + Formylierung.

Die Punkte stellen die ^{14}C -Radioaktivität auf einem 0,5 cm breiten Streifen des Papierchromatogramms dar. $R_f = 0,27$: Methioninsulfoxid, $R_f = 0,37$: N-Formylmethioninsulfoxid, $R_f = 0,57$: Methionin, $R_f = 0,85$: N-Formylmethionin.

R_f -Werte der Deacylierungsprodukte stimmen mit den R_f -Werten der Referenzsubstanzen (^{14}C)Methionin und N-Formyl- (^{14}C)Methionin überein. Unter diesen Bedingungen konnte für $\text{Met-tRNA}_f^{\text{Met}}$ aus E.coli vollständige Formylierung nachgewiesen werden. $\text{Met-tRNA}_2^{\text{Met}}$ wurde zu 30 % formyliert. An der $\text{tRNA}_4^{\text{Met}}$ ist kein Formylmethionin entstanden. Bei der Reaktion von $\text{tRNA}_1^{\text{Met}}$ und $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ wurde ein geringer Anteil Formylmethionin gebildet.

In weiteren Formylierungsexperimenten wurde mit dem synthetisierten $\text{N}^5, \text{N}^{10} (^{14}\text{C})\text{Methenyltetrahydrofolat}$ als Formyldonator gearbeitet, um die Zeitabhängigkeit der Formylierungsreaktion verfolgen zu können. Zunächst wurde überprüft, ob der Einbau von Radioaktivität tatsächlich auf den Transfer der Formylgruppe auf tRNA-gebundenes Methionin zurückzuführen ist. Aus Abb.13 geht hervor, daß in einer Gesamt-tRNA aus E.coli für ca. 45 % der aminoacylierbaren (isoakzeptierenden) tRNA^{Met} ^{14}C -Einbau aus dem ^{14}C -Formyldonator gemessen wird. Nach Verlust der Aminoacylierungskapazität der tRNA durch Perjodatoxidation findet kein ^{14}C -Einbau mehr statt. Eine reine $\text{tRNA}_f^{\text{Met}}$ -Spezies aus E.coli (1200 pMol/ $\text{E}_{260\text{nm}}$ -Einheit) wurde unter den Reaktionsbedingungen vollständig formyliert (Abb.14).

Die Aminoacylierungs- und Formylierungskinetiken der Reaktion von $\text{tRNA}_f^{\text{Met}}$ (E.coli) und den vier tRNA^{Met} -Spezies sind in Abb.15 dargestellt. Daraus geht hervor, daß nur $\text{tRNA}_2^{\text{Met}}$ nach Aminoacylierung vergleichbar mit

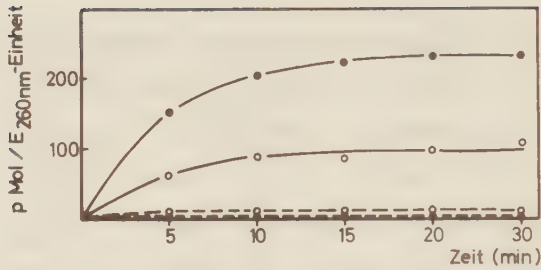


Abb. 13 Zeitabhängigkeit der Aminoacylierung und Formylierung einer Gesamt-tRNA aus *E. coli* vor und nach Perjodatoxidation.

Vor Oxidation der tRNA ($2,8 E_{260nm}$ -Einheiten): (●—●) Aminoacylierung, (○—○) Formylierung. Nach Perjodatoxidation der tRNA ($3 E_{260nm}$ -Einheiten): (●---●) Aminoacylierung, (○---○) Formylierung.

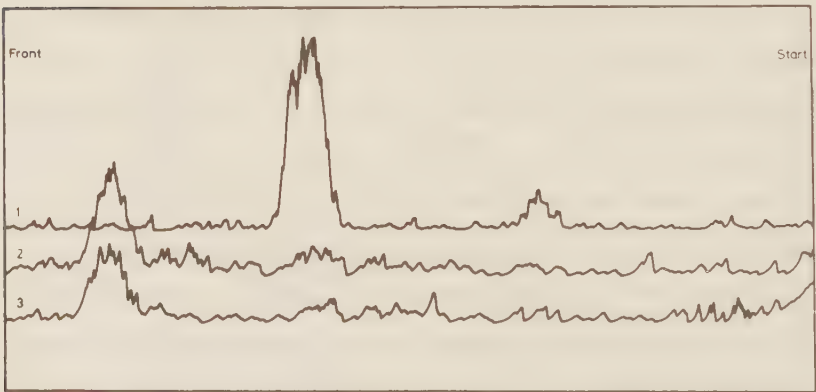


Abb. 14 Papierchromatographie des Deacylierungsprodukts von N-(^{14}C)Formyl-Met-tRNA^{Met} aus *E. coli*.

1: Referenz (^{14}C)Methionin, 2: Deacylierungsprodukt, 3: Referenz N-Formyl-(^{14}C)Methionin. Das Chromatogramm wurde mit einem Dünnschichtscanner abgefahren.

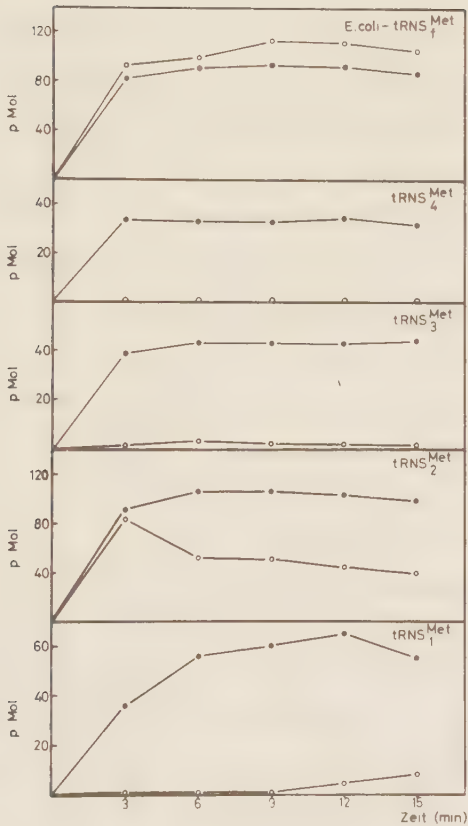


Abb.15 Zeitabhängigkeit der Aminoacylierung und Formylierung der tRNA_f^{Met}(E.coli) und der tRNA^{Met}-Einzelspezies.

(●—●) Aminoacylierung, (○—○) Formylierung. In die Experimente wurden zwischen 0,06 und 0,18 E_{260nm}-Einheiten eingesetzt. Der Kontrollwert ohne tRNA (45cpm) entsprach 1 pMol(Aminoacylierung) bzw. 6 pMol (Formylierung).

$\text{tRNS}_f^{\text{Met}}$ aus E.coli formyliert wird. Das Absinken der Formylierung nach 3 Minuten im Falle der $\text{tRNS}_2^{\text{Met}}$ war reproduzierbar und konnte auch durch Veränderung der tRNS- bzw. Formyldonatorkonzentration nicht verändert werden. Für $\text{tRNS}_2^{\text{Met}}$ und $\text{tRNS}_f^{\text{Met}}$ (E.coli) verliefen die Kinetiken ebenso, wenn nur mit Enzymrohextrakt aus E.coli inkubiert wurde. In keinem Fall konnte nur durch die Enzympräparation aus Hühnerembryonenmuskulatur allein eine Formylierung erzielt werden. Geringfügige Formylierung wurde auch für die Spezies 1 und 3 beobachtet.

3.2.5.3. Ribosomenbindung

Es ist verschiedentlich gezeigt worden (73,74), daß die Initiator-tRNS aus dem Cytoplasma von höheren Organismen ihre Initiatorfunktion im zellfreien ribosomalen System aus E.coli ebenso wie $\text{tRNS}_f^{\text{Met}}$ (E.coli) ausüben kann. Um die isolierte $\text{tRNS}_2^{\text{Met}}$ daraufhin zu untersuchen, wurde mit Hilfe des Filter-Bindungs-Assays von Nirenberg und Leder (75) die Bindung der fMet- $\text{tRNS}_2^{\text{Met}}$ an 30S- und 50S-Ribosomenuntereinheiten aus E.coli bei 8 mM Mg^{2+} gemessen und mit der Bindung der fMet- $\text{tRNS}_f^{\text{Met}}$ aus E.coli verglichen. In Abb.16 ist die molare Bindung von fMet- tRNS^{Met} je Mol 50S-Partikel aufgetragen als Funktion des molaren Verhältnisses zwischen eingegebener fMet- tRNS^{Met} und 50S-Partikeln. Oberhalb eines Konzentrationsverhältnisses von 2 nimmt die Bindung von fMet- $\text{tRNS}_2^{\text{Met}}$ wieder ab.

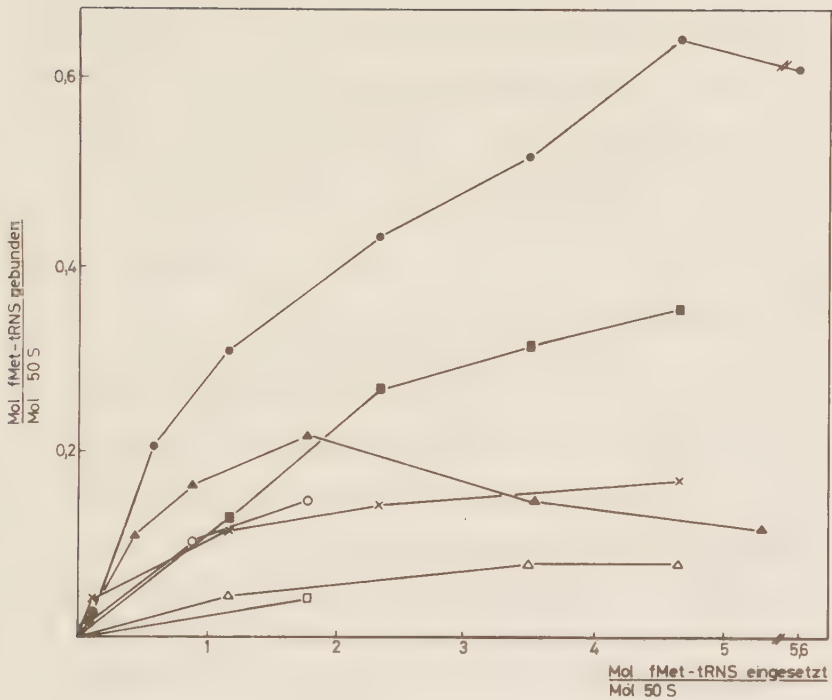


Abb. 16 Bindung von fMet-tRNA_f^{Met} an E.coli-Ribosomen. fMet-tRNA_f^{Met} (E.coli): (●-●) vollständiges System, (■-■) ohne AUG, (x-x) ohne Initiationsfaktoren, (Δ-Δ) ohne AUG und ohne Initiationsfaktoren. fMet-tRNA₂^{Met}: (▲-▲) vollständiges System, (o-o) ohne Initiationsfaktoren, (□-□) ohne AUG. Die 50S-Untereinheiten waren der limitierende Bestandteil für die Rekonstitution der 70S-Ribosomen.

An diesem Punkt beträgt sie etwa $2/3$ der Bindung der homologen $fMet-tRNS_f^{Met}$. Die Bindung der homologen $fMet-tRNS_f^{Met}$ wird durch das Codon AUG um den Faktor 2 stimuliert, die Bindung der heterologen um den Faktor 3-4. Entsprechend stimulieren die Initiationsfaktoren homolog dreifach und heterolog zweifach.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die methioninspezifische $tRNS$ einer Gesamt- $tRNS$ -Präparation aus der Muskulatur 13 Tage alter Hühnerembryonen isoliert und in die vier isoakzeptierenden Einzelspezies $tRNS_1^{Met}$, $tRNS_2^{Met}$, $tRNS_3^{Met}$ und $tRNS_4^{Met}$ aufgetrennt. Für die Isolierung der $tRNS^{Met}$ wurde eine Methode der chemischen Derivatisierung mit chromatographischen Verfahren kombiniert. Auf chemischem Wege wurde ein Derivat der $Met-tRNS^{Met}$ hergestellt, das unter Ausnutzung der besonderen Eigenschaften von BD-Cellulose chromatographisch von der anderen $tRNS$ abgetrennt werden konnte. Aus der auf diesem Wege isolierten $tRNS^{Met}$ wurden durch Reversed-Phase-5-Chromatographie vier Einzelspezies getrennt dargestellt. Die Einzelspezies wurden in einigen biochemischen Eigenschaften und biologischen Funktionen charakterisiert.

Die Reaktion im Reinigungsverfahren, welche die Spezifi-

fität der Derivatisierung gewährleistete, war die Aminoacylierung der tRNA^{Met} . Es wurde jeweils kontrolliert, daß die Aminoacylierungskapazitäten im Plateau der Zeitabhängigkeit gemessen wurden. Daher repräsentieren die chromatographisch dargestellten relativen Mengen der Einzelspezies mit großer Wahrscheinlichkeit die tRNA^{Met} -Population in der Muskulatur 13 Tage alter Hühnerembryonen, zumal nicht angenommen werden muß, daß die Gleichgewichtslage der Aminoacylierungsreaktion in Bezug auf eine tRNA^{Met} -Einzelspezies vom Normalfall der nahezu 100 %igen Aminoacylierung abweicht.

Bei der Reinigung der tRNA einer Aminosäurespezifität aus differenziertem Eukaryontengewebe können mit den heute verfügbaren Methoden nur geringe Ausbeuten erzielt werden. Die Gesamtausbeute der methioninspezifischen tRNA betrug 10,5 % der anfänglichen Methionin-Akzeptorkapazität. Das heißt, aus 1 g Gewebe konnten nur 2 μg tRNA^{Met} gewonnen werden. Diese Ausbeute ist vergleichbar mit den tRNA^{Met} -Ausbeuten, die durch andere Reinigungsmethoden erzielt wurden (76).

Nach dem ersten Reinigungsschritt (BD-Cellulose-Chromatographie, Abb.2,I) war die spezifische Methionin-Akzeptorkapazität der tRNA niedriger als im tRNA -Ausgangsmaterial. Daraus errechnet sich ein Verlust von 33 % der tRNA^{Met} , obwohl nach der Chromatographie alle Fraktionen mit Methionin-Akzeptorkapazität vereinigt wurden (Abb.3).

Verluste solcher Größenordnung wurden bei diesem Reinigungsschritt immer beobachtet. Bei der Reinigung anderer tRNS-Arten dagegen wurden hier nicht so hohe Verluste gemessen (6). Ob es sich um Verluste handelt, die für tRNS^{Met} spezifisch sind, kann nicht entschieden werden. Vorstellbar wäre zum Beispiel, daß assoziierte tRNS^{Met}- Fragmente im tRNS-Ausgangsmaterial von der L-Methionin:tRNS-Ligase (AMP) wie intakte Moleküle erkannt werden. Für tRNS^{Val} ist bekannt (77), daß solche Fragmente aminoacylierbar sind. Im vorliegenden Fall würden sie die Akzeptorkapazität im tRNS-Ausgangsmaterial mitbestimmen und nach der BD-Cellulose-Chromatographie den Verlust von funktionsfähiger tRNS vortäuschen. In der Polyacrylamidgel-Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (Abb.8) wären solche tRNS-Fragmente aufgrund ihrer weiteren Wanderung nachweisbar. Bei der Elektrophorese von 0,5 E_{260nm}-Einheiten würden sie bei dem Verlust an Methionin-Akzeptorkapazität nach dem hier diskutierten Chromatographieschritt nur 0,0025 E_{260nm}-Einheiten ausmachen. Sie blieben daher unterhalb der Nachweisgrenze in der Elektrophorese. Eine andere Ursache für die gemessenen Verluste könnten denaturierende Einflüsse sein, die bei der BD-Cellulose-Chromatographie für tRNS^{Met} wirksam werden. In der Derivatisierungsreaktion (Abb.2,III) wurden lediglich 30 % der Met-tRNS^{Met} derivatisiert und als 2-Naphthoxyacetylderivat durch die nachfolgende BD-Cellulose-

Chromatographie von anderer tRNS abgetrennt. Der überwiegende Anteil der Met-tRNS^{Met} dagegen ging für den weiteren Reinigungsweg verloren und wurde gemeinsam mit anderer tRNS desorbiert (Abb.5). In Abweichung von den Vorversuchen im kleinen Maßstab, bei denen bis zu 72 % der Met-tRNS^{Met} derivatisiert werden konnten, wurde im Hauptversuch bei einer hohen Met-tRNS^{Met}-Konzentration gearbeitet, um die Derivatisierungsreaktion zu begünstigen. In höherer Konzentration wird auch die Oxidation des Methionins begünstigt. Methionin ist im sauren Bereich sehr labil, da dann der in der Aminosäureseitenkette zweiwertig gebundene Schwefel leicht zu vierwertigem (Methioninsulfoxid) und zu sechswertigem Schwefel (Methioninsulfon) oxidiert werden kann. Der Mechanismus der Derivatisierung durch Esteraminolyse analog der Verseifung von Estern erfordert den nucleophilen Angriff der Aminokomponente (NH₂-Gruppe des Methionins) auf das Carboxyl-C-Atom des aktiven Esters (71). Im oxidierten Methionin befindet sich die elektronenanziehende Sulfoxid- bzw. Sulfongruppe kaum in ausreichender Nähe zur Aminogruppe, um über einen -I-Effekt das nucleophile Potential der Aminokomponente reduzieren zu können. Aber die großvolumige Sulfongruppe in räumlicher Nähe zur Aminogruppe könnte den Angriff des relativ großen 2-Naphthoxyacetylesters sterisch behindern. Obwohl die Thioäthergruppierung im Methionin bei niedrigem pH-Wert

so oxidationslabil ist, mußte Met-tRNS^{Met} zur Stabilisierung der Aminoacyl esterbindung bei pH 5 gelöst werden. Dabei sollte allerdings in Abweichung von der beschriebenen Methode (53) in weniger konzentrierten Lösungen gearbeitet werden.

Die isolierte tRNS^{Met} konnte durch Reversed-Phase-5-Chromatographie (Abb.2,VI) in vier tRNS^{Met}-Einzelspezies aufgetrennt werden. Die Einzelspezies 2, 3 und 4 besitzen die spezifischen Methionin-Akzeptorkapazitäten, die allgemein für isolierte tRNS-Spezies beobachtet werden. Eine relativ niedrige spezifische Akzeptorkapazität wurde für tRNS₁^{Met} gemessen. Die Präparation dieser Spezies enthielt auch die höchste Kontamination mit anderen tRNS-Arten (3.2.2.), die jedoch zur Erklärung der niedrigen Akzeptorkapazität zu gering ist. Da die Polyacrylamidgel-Elektrophorese nur etwa 5 % höhermolekulare Anteile und kein weiter als tRNS wanderndes Material zeigt (Abb.8), kann ausgeschlossen werden, daß eine Ansammlung von nicht aminoacylierbaren tRNS-Fragmenten in dieser Präparation sich auswirkt. Der quantitative Vergleich der Methionin-Akzeptorkapazitätsverteilung mehrerer Reversed-Phase-5-Chromatographieläufe ergibt, daß tRNS₁^{Met} durchschnittlich 7 % der gesamten Akzeptorkapazität ausmacht. Entsprechend beträgt der Anteil dieser Spezies nach der Chromatographie der isolierten tRNS^{Met} 6,8 %, d.h. die Ausbeute dieser Spezies, gemessen in pMol, liegt in der zu erwartenden

Größenordnung. Eine selektive Schädigung der $\text{tRNA}_1^{\text{Met}}$ während der Reinigung kann daher ausgeschlossen werden. Die niedrige spezifische Methionin-Akzeptorkapazität der Spezies 1 muß auf Verunreinigungen durch UV-Licht absorbierendes Material zurückgeführt werden, das in der Elektrophorese wie tRNA wandert. Dabei handelt es sich höchstwahrscheinlich um geschädigte, nicht mehr aminoacylierbare tRNA^{Met} -Moleküle aller Spezies, die nach Reversed-Phase-5-Chromatographie in der Position von $\text{tRNA}_1^{\text{Met}}$ angereichert sind.

In der Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde für die von anderer tRNA abgetrennte tRNA^{Met} eine Kontamination mit 5S- oder höhermolekularer ribosomaler RNS nachgewiesen (Abb.6). Durch die differentiellen 2-Propanolfällungen bei der Herstellung des tRNA-Ausgangsmaterials und durch die nachfolgenden Chromatographieschritte während der Reinigung wurde diese RNS offensichtlich nicht abgetrennt. Besonders bei den Mg^{2+} -Konzentrationen während des Reinigungsgangs, die für die Erhaltung der tRNA-Tertiärstruktur notwendig sind, können Assoziate zwischen tRNA und 5S-RNS entstehen. Die Sequenz GpApApC in 5S-RNS ist (auch bei Eukaryonten) komplementär zu der GpTpΨpC-Sequenz der tRNA (78), und spezifische Interaktionen eines GpTpΨpC-Fragments mit 5S-RNS konnte nachgewiesen werden (79). Die Ergebnisse einer weiteren Elektrophorese der tRNA^{Met} -Einzelspezies (Abb.8) zeigen, daß der über-

wiegende Anteil der ribosomalen RNS in tRNS^{Met} nach Reversed-Phase-5-Chromatographie abgetrennt wurde. Die nachgewiesene geringe Fremdakzeptorkapazität in den Präparationen der tRNS^{Met} - Einzelspezies beweist die hohe Qualität des angewandten Reinigungsverfahrens. Sie kann drei Ursachen haben: 1.) Freisetzung von Aminosäuren während der Aminoacylierungsreaktion und nachfolgende Derivatisierung der entsprechenden Aminoacyl-tRNS, 2.) reversible Derivatisierung an tRNS-Molekülen selbst, 3.) Fremdbeladung der tRNS^{Met} mit anderen Aminosäuren. Während die dritte Möglichkeit sehr unwahrscheinlich ist, kann nicht entschieden werden, welche der beiden erstgenannten Ursachen für die Fremdakzeptorkapazität verantwortlich ist.

Die nachgewiesene minimale Kontamination der Einzelspezies untereinander (Abb.10) ist ein Beweis für das hohe Auflösungsvermögen des Reversed-Phase-5-Chromatographiesystems, in dem zwei physikalische Prinzipien (Gegenstromverteilung und Anionenaustausch) optimal wirksam werden.

Wie unter 3.2.4. erwähnt, ergibt sich die Stabilität einer Aminoacylesterbindung nicht allein aus dem chemischen Charakter der Aminosäure - dann wäre sie für alle Aminoacylesterbindungen dieser Aminosäure mit isoakzeptierenden tRNS-Spezies gleich. Auch Unterschiede zwischen isoakzeptierenden Spezies, die sich auf die Tertiär-

struktur des Moleküls auswirken, könnten Einfluß auf die Bindung haben, zumal die veresterte Aminosäure nicht vom tRNS-Molekül wegzuragen, sondern nahe dem Akzeptor-ende anzuliegen scheint - möglicherweise unter Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen (80). Unter diesen Gesichtspunkten wurden die Halbwertzeiten der Met-tRNS^{Met}-Esterbindungen bei alkalischer Hydrolyse gemessen. Im Ergebnis wurden für die einzelnen Spezies unterschiedliche Mittelwerte zwischen 4,11 und 4,53 Minuten gefunden, wobei allerdings nur zwischen Spezies 1 und 2 ein signifikanter Unterschied besteht. Aus dem halblogarithmisch linearen Verlauf der Reaktion kann geschlossen werden, daß die Hydrolyse der Aminoacyl-esterbindung als einzige Reaktion gemessen und nicht durch weitere Reaktionen überlagert wurde. Dies ist daher gleichzeitig ein Reinheitskriterium für die Präparationen der Einzelspezies.

Bei der Reversed-Phase-5-Chromatographie werden tRNS^{Met}₁ und tRNS^{Met}₂, wenn sie mit Methionin beladen sind, in umgekehrter Reihenfolge desorbiert. Diese Verhaltensänderung ist möglicherweise dadurch zu erklären, daß die beiden Spezies durch die Aminoacylierung eine Konformationsänderung erfahren haben. Diese Vermutung müßte durch aufwendigere Methoden, z.B. durch Hochgeschwindigkeitssedimentationsanalyse in der Analytischen Ultrazentrifuge bestätigt werden. Ob das tRNS-Molekül durch

die Aminoacylierung seine Konformation ändert, ist bisher nicht geklärt. Entsprechende Untersuchungen sind aufgrund der Labilität der Aminoacyl-esterbindung sehr schwierig. Die Aminosäure kann aber über eine NH_2 -Gruppe anstelle der 3'-OH-Gruppe der tRNA wesentlich stabiler an die tRNA gebunden werden. Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen an solcher, über eine Amidbindung stabilisierter Phe-tRNA^{Phe} von Kan et al. (81) deuten auf leichte Konformationsänderungen der Aminoacyl-tRNA gegenüber der tRNA hin.

Die Formylierungsexperimente der Met-tRNA^{Met}- Einzelspezies zeigen, daß nur tRNA₂^{Met} formyliert werden kann. Die Formylierung betrug 30 %. Einige reduzierte Pteroylderivate, die mit dem Formyldonator derselben Stoffklasse angehören, sind als Inhibitoren der Transformylase-Aktivität charakterisiert worden (82). Die Inhibition durch solche reduzierten Pteroylderivate kann ausgeschlossen werden, da sie auch in der Formylierungsreaktion mit Met-tRNA_f^{Met} (E.coli) wirksam werden müßte. Diese tRNA wird jedoch parallel zur Aminoacylierungsreaktion vollständig formyliert (Abb. 14 und 15). Weiterhin könnte angenommen werden, daß 70 % der tRNA₂^{Met}- Moleküle so geschädigt sind, daß sie von der Transformylase nicht mehr erkannt werden können, obwohl sie aminoacylierbar sind. Wenn allerdings nur ein Teil der tRNA₂^{Met} formylierbar wäre, müßte in der Formylierungsreaktion ein Plateau

erreicht werden. Die zunächst parallel zur Aminoacylierung steil ansteigende, dann stark abfallende Formylierungskinetik der $\text{Met-tRNA}_2^{\text{Met}}$ läßt daher eher auf deformylierende Aktivitäten schließen. Die von Tetrahydrofolat abhängige Deformylierung der $\text{fMet-tRNA}_f^{\text{Met}}$ durch Transformylase ist demonstriert worden (83). Allerdings liegt das Optimum der Rückreaktion bei pH 6. Ob der in diesem Experiment beobachtete Abfall tatsächlich auf Deformylierung beruht, konnte nicht bewiesen werden. Ohne weiterführende Experimente ist daher die Aussage möglich, daß von den isoakzeptierenden tRNA^{Met} -Spezies nur die $\text{tRNA}_2^{\text{Met}}$ -Spezies formylierbar und infolgedessen der funktionellen Klasse $\text{tRNA}_f^{\text{Met}}$ zuzuordnen ist. Geringe Formylierungen, die für $\text{tRNA}_1^{\text{Met}}$ und $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ gefunden wurden, sind mit der Kontamination dieser Spezies durch $\text{tRNA}_2^{\text{Met}}$ korrelierbar.

Auch aus dem Bindungsverhalten der $\text{tRNA}_2^{\text{Met}}$ an E.coli-Ribosomen ergibt sich, daß diese Spezies eine Initiator-tRNA ist. Für die homologe $\text{fMet-tRNA}_f^{\text{Met}}$ (E.coli) wird auch ohne AUG eine relativ hohe Bindung gemessen. Diese Beobachtung steht im Zusammenhang mit der noch nicht geklärten Frage, ob $\text{fMet-tRNA}_f^{\text{Met}}$ oder aber die mRNA bzw. das Triplet AUG zuerst gebunden wird; ungeklärt ist auch, welche kooperativen Effekte zwischen den Reaktionspartnern einschließlich der Initiationsfaktoren die Bindung im einzelnen beeinflussen (84). Bindungen

von 0,6 bis 0,8 Mol fMet-tRNS_f^{Met} pro Mol Ribosom, die durch AUG um den Faktor 2-4 stimuliert sind, werden üblicherweise in solchen Bindungsexperimenten beobachtet (V.A. Erdmann, persönliche Mitteilung). Für die heterologe fMet-tRNS₂^{Met} hat die Bindungskurve zunächst dieselbe Steigung wie im homologen System. Hier setzt sofort auch ein der Bindung gegenläufiger Prozeß ein. Wie durch Differenzbildung der beiden Bindungskurven deutlich wird, nimmt die Zahl der nicht zustande kommenden oder gelösten Bindungen mit steigender fMet-tRNS₂^{Met}-Konzentration linear zu. Obwohl die Bindung der tRNS₂^{Met} von einem gegenläufigen Prozeß überlagert ist, verhält sich diese Spezies in den Bindungsversuchen wie E.coli-tRNS_f^{Met} und ist damit als Initiator-tRNS charakterisiert. Der beobachtete gegenläufige Prozeß bedarf der weiteren Klärung. Möglicherweise binden tRNS-Fragmente kompetitiv am Ribosom oder aber eine kontaminierende Molekulart entzieht dem System für die Bindung notwendige Reaktionspartner, z.B. Initiationsfaktoren. Für beide Möglichkeiten wurden allerdings in den Kontaminationstests und in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese keine Hinweise gefunden.

Durch die Ribosomenbindungsstudien konnte tRNS₂^{Met} als Initiator-tRNS identifiziert werden. Durch die Formylierungsexperimente wurden alle vier isoakzeptierenden tRNS^{Met}-Spezies ihrer klassischen Aufgabenverteilung zugeordnet. Wie für andere tRNS-Arten bleibt auch im

Fall der isoakzeptierenden tRNA^{Met} -Spezies offen, warum für die Elongation der wachsenden Polypeptidkette am Ribosom drei verschiedene tRNA^{Met} -Spezies vorgesehen sind und ob diese Spezies auch weitere, in der Einleitung erwähnte Funktionen im Zellgeschehen erfüllen. Die Reिनigung der vier isoakzeptierenden tRNA^{Met} -Spezies bildet die Grundlage für Experimente, die zum Verständnis der Vielfalt isoakzeptierender tRNA -Spezies beitragen werden.

5. Zusammenfassung

Die methioninspezifische tRNA einer Gesamt- tRNA -Präparation aus der Muskulatur 13 Tage alter Hühnerembryonen wurde gereinigt und in vier isoakzeptierende Einzelspezies $\text{tRNA}_1^{\text{Met}}$, $\text{tRNA}_2^{\text{Met}}$, $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ und $\text{tRNA}_4^{\text{Met}}$ aufgetrennt.

Die Isolierung der tRNA^{Met} von aller anderen tRNA gelang durch die Kombination biologischer, chemischer und chromatographischer Methoden.

In der Gesamt- tRNA -Präparation wurde die methioninspezifische tRNA aminoacyliert und in einer nachfolgenden Reaktion an der α -Aminogruppe des Methionins derivatisiert. Die Aminoacylierungs- und Derivatisierungsreaktionen wurden in Vorversuchen optimiert.

Aufgrund der Interaktionen des hydrophoben 2-Naphthoxyacetylsubstituenten an der $\text{Met-tRNA}^{\text{Met}}$ mit den aromatischen Benzoylgruppen der BD-Cellulose war die Isolierung der derivatisierten $\text{Met-tRNA}^{\text{Met}}$ durch einen einzigen

chromatographischen Schritt möglich. Die auf diesem Wege isolierte tRNS^{Met} wurde durch hochauflösende Reversed-Phase-5-Chromatographie in die vier isoakzeptierenden Einzelspezies aufgetrennt.

Die Spezies 2,3 und 4 zeigten die spezifischen Methionin-Akzeptorkapazitäten, die für reine tRNS -Spezies beobachtet werden; für Spezies 1 konnte nur eine geringere Akzeptorkapazität nachgewiesen werden.

Die Reinheit der isolierten Einzelspezies wurde durch Poyacrylamidgel-Elektrophorese, Test auf Kontamination mit anderer tRNS und durch Rechromatographie am Reversed-Phase-5-System überprüft.

Die Einzelspezies wurden auf ihre Aminoacylierbarkeit und Formylierbarkeit durch die entsprechenden Enzyme aus *E.coli* getestet. Nur $\text{tRNS}_2^{\text{Met}}$ ist heterolog aminoacylierbar. In den Experimenten mit nicht radioaktivem Formyldonator und mit dem synthetisierten (^{14}C)Formyldonator wurde allein für $\text{tRNS}_2^{\text{Met}}$ Formylierung nachgewiesen und diese Spezies als eine $\text{tRNS}_f^{\text{Met}}$ charakterisiert.

Auch durch das Bindungsverhalten der $\text{fMet-tRNS}_2^{\text{Met}}$ an *E.coli*-Ribosomen im Vergleich mit $\text{fMet-tRNS}_f^{\text{Met}}$ (*E.coli*) konnte $\text{tRNS}_2^{\text{Met}}$ als Initiatorspezies identifiziert werden.

Die Ergebnisse charakterisieren die Spezies 1, 3 und 4 als Angehörige der funktionellen Klasse $\text{tRNS}_m^{\text{Met}}$ und die Spezies 2 als Initiatorspezies $\text{tRNS}_f^{\text{Met}}$.

Diese Arbeit wurde durch Gewährung von Sach- und Personalmitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft an das Teilprojekt Gottschling im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 29 "Embryonale Entwicklung und Differenzierung (Embryonalpharmakologie)" teilweise finanziell gefördert.

6. Literaturverzeichnis

1. F.H.C. Crick,
Symp. Soc. Exptl. Biol. 12, 138 (1958)
2. T. Caskey, A. Beaudet und M. Nirenberg,
J.Mol. Biol. 37, 99 (1968)
3. B.P. Doctor, J. Apgar und R.W. Holley,
J. Biol. Chem. 37, 99 (1961)
4. B.J. Ortwerth und L.P. Liu,
Biochem. 12, 3978 (1973)
5. R.L. Pearson, C.W. Hancher, J.F. Weiss, D.W. Holladay
und A.D. Kelmers,
Biochim. Biophys. Acta 294, 236 (1973)
6. B. Wittig, S. Reuter und H. Gottschling,
Biochim. Biophys. Acta, 331, 221 (1973)
7. N. Sueoka und T. Kano-Sueoka,
in "Progress in Nucleic Acid Research and Molekular
Biology" Vol. 10, S.23 (1970), Academic Press,
New York und London
8. U.Z. Littauer und H. Inouye,
Ann. Rev. Biochem. 42, 439 (1973)
9. J.E. Brenchley und I.S. Williams,
Ann. Rev. Microbiol. 29, 251 (1975)
10. P.H. Mäenpää und J. Ahonen,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 179 (1972)
11. J.P. Garel,
J. Theor. Biol. 43, 225 (1974)
12. A. Zilberstein, B. Dudock, H. Berissi und M. Revel
J. Mol. Biol. 108, 43 (1976)

13. R.L. Soffer,
Adv. Enzymol. 40, 91 (1974).
14. J.M. Ghuysen,
Bacteriol. Rev. 32, 425 (1968).
15. F. Harada, R.C. Sawyer und J.E. Dahlberg,
J. Biol. Chem. 250, 3487 (1975).
16. K.A. Marcker und F. Sanger,
J. Mol. Biol. 8, 835 (1964).
17. K.A. Marcker,
J. Mol. Biol. 14, 63 (1965).
18. B.F.C. Clark und K.A. Marcker,
J. Mol. Biol. 17, 394 (1966).
19. B.F.C. Clark und K.A. Marcker,
Nature 211, 378 (1966).
20. J.M. Adams und M.R. Capecchi,
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 55, 147 (1966).
21. P.S. Rudland und B.F.C. Clark,
in "The Mechanism of Protein Synthesis and its
Regulation" (1972) North-Holland Publishing Company,
Amsterdam, London.
22. K. Nierhaus und J. Weber,
Umschau in Wissenschaft und Technik 11, 378 (1972).
23. P.S. Rudland, W.A. Whybrow, K.A. Marcker und
B.F.C. Clark,
Nature 222, 750 (1969).
24. A.E. Smith und K.A. Marcker,
Nature 226, 607 (1970).
25. J.P. Leis und E.B. Keller,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 416 (1970).

26. C.T. Caskey, B. Redfield und H. Weissbach,
Arch. Biochem. Biophys. 120, 119 (1967).
27. J. Lucas-Lenard und F. Lipmann,
Ann. Rev. Biochem. 40, 409 (1971).
28. K. Gosh, H.P. Gosh, M. Simsek und U.L. RajBhandary,
J. Biol. Chem. 249, 4720 (1973).
29. A. Yarwood, D. Boulter und J.N. Yarwood,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 353 (1971).
30. H.U. Petersen, A. Danchin und M. Grunberg-Manago,
Biochemistry 15, 1357 und 1362 (1976).
31. R. Giegé, J.P. Ebel, M. Springer und
M. Grunberg-Manago,
FEBS Letters 37, 166 (1973).
32. S.K. Dube, K.A. Marcker, B.F.C. Clark und S. Cory,
Nature 218, 232 (1968).
33. Y. Yamada und H. Ishikura,
FEBS Letters 54, 155 (1975).
34. M. Simsek und U.L. RajBhandary,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 508 (1972).
35. A.M. Gillum, N. Uquhart, M. Smith und
U.L. RajBhandary,
Cell 6 395 (1975).
36. M. Simsek, U.L. RajBhandary, M. Boissard und
G. Petrissant,
Nature 247, 518 (1974).
37. P.W. Piper und B.F.C. Clark,
Nature 247, 516 (1974).
38. A.M. Gillum, M.P.J.S. Anandaraj, B.A. Roe und
U.L. RajBhandary,
Cell 6, 407 (1975).

39. H.P. Gosh, D. Söll und H.G. Khorana,
J. Mol. Biol. 25, 275 (1967).
40. S. Cory, K.A. Marcker, S.K. Dube und B.F.C. Clark,
Nature 220, 1039 (1968).
41. H. Rogg, P. Müller und M. Staehelin,
Eur. J. Biochem. 53, 115 (1975).
42. P.W. Piper,
Eur. J. Biochem. 51, 283 (1975).
43. R.C. Sawyer und J.E. Dahlberg,
J. Virol. 12, 1226 (1973).
44. G. Petrissant und M. Boissard,
Biochimie 56, 787 (1974).
45. R.T Walker und U.L. RajBhandary,
Nucleic Acid Res. 2, 61 (1975).
46. P. Guillemaut und J.H. Weil,
Biochim. Biophys. Acta 407, 240 (1975).
47. S. Wang, R. M. Kothari und M. Taylor,
Nature New Biol. 242, 133 (1973).
48. K.T. Elder und A.E. Smith,
Nature 247, 435 (1974).
49. K.K. Bose, N.K. Chatterjee und N.K. Gupta,
in "Methods in Enzymology" Vol. XXIV Part E,
S. 522 (1974), Academic Press, New York, London.
50. G. Zubay,
J. Mol. Biol. 4, 347 (1962).
51. F.J. Bollum,
J. Biol. Chem. 234, 2733 (1959).

52. J. Preiss, P. Berg, E.J. Ofengand, F.H. Bergmann
und M. Diekmann,
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 45, 319 (1959).
53. I. Gillam, D. Blew, R.C. Warrington,
M. v. Tigerstrom und G.M. Tener,
Biochemistry 7, 3459 (1968).
54. J.S. Dubnoff und U. Maitra,
in "Methods in Enzymology" Vol. XX Part C,
S. 248 (1971), Academic Press, New York, London.
55. P.S. Sarin und P.C. Zamecnik,
Biochim. Biophys. Acta 91, 653 (1964).
56. J.C. Seehahn und G.P. Hess,
J. Am. Chem. Soc. 77, 1067 (1955).
57. H.G. Khorana,
in "Some Recent Developments in the Chemistry of
Phosphate Esters of Biological Interest" S. 126 (1961)
John Wiley & Sons, Inc., New York, London.
58. G.W. Anderson, J.E. Zimmerman und F.M. Callahan,
J. Am. Chem. Soc. 86, 1839 (1964).
59. F.M. Huennekens, P.P.K. Ho und K.G. Scrimgeour,
in "Methods in Enzymology" Vol. VI, S. 806 (1963)
Academic Press, New York, London.
60. P.N. Campbell, T.S. Work und E. Mellanby,
Biochem. J. 48, 106 (1951).
61. G.A. Bray,
Anal. Biochem. 1, 279 (1960).
62. I. Gillam, S. Millward, D. Blew, M. v. Tigerstrom,
E. Wimmer und G.M. Tener,
Biochemistry 6, 3043 (1967).

63. R.C. Pearson, J.F. Weiss und A.D. Kelmers,
Biochim. Biophys. Acta 228, 770 (1971).
64. B. Wittig,
Dissertation (1976), Freie Universität Berlin.
65. E.G. Richard, J.A. Coll und W.B. Gratzer,
Anal. Biochem. 12, 452 (1963).
66. S. Reüter,
Dissertation (1976), Freie Universität Berlin.
67. B. Wittig, S. Reuter und H. Gottschling,
Eur. J. Biochem. 49, 521 (1974).
68. P.C. Zamecnik, M.L. Stephenson und J.F. Scott,
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 46, 811 (1960).
69. H.G. Zachau, M. Tada, W.B. Lawson und M. Schweiger,
Biochim. Biophys. Acta 53, 221 (1961).
70. A.H. Mehler,
in "Methods in Enzymology" Vol. XX, Part C, S. 203
(1971), Academic Press, New York, London.
71. H.D. Jakubke und H. Jeschkeit,
in "Aminosäuren, Peptide, Proteine" S. 124 ff,
Akademie-Verlag, Berlin (1973).
72. D. Hentzen, P. Mandel und J.P. Garel,
Biochim. Biophys. Acta 281, 228 (1972).
73. A.E. Smith und K.A. Marcker,
J. Mol. Biol. 38, 241 (1968).
74. K. Takeishi und T. Ukita,
J. Biol. Chem. 243, 5761 (1968).
75. M. Nirenberg und P. Leder,
Science 145, 1399 (1964).

76. S. Nishimura, F. Harada, U. Narushima und T. Seno,
Biochim. Biophys. Acta 142, 133 (1967).
77. A.D. Mirzabekov, D. Lastity, E.S. Levina
und A.A. Bayev,
FEBS Letters 7, 95 (1970).
78. G.G. Brownlee und F. Sanger,
J. Mol. Biol. 23, 337 (1967).
79. V.A. Erdmann, M. Sprinzl und O. Pongs,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 942 (1973).
80. O. Pongs, P. Wrede, V.A. Erdmann und M. Sprinzl,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, 1025 (1976).
81. L.S. Kan, P.O. Ts'o, M. Sprinzl, F. v.d. Haar,
und F. Cramer,
Biophys. J. 16, 11a (1974).
82. H.W. Dickermann und B.C. Smith,
Biochemistry 9, 1247 (1970).
83. H.W. Dickermann,
in "Methods in Enzymology" Vol. XX, Part C,
S. 182 (1971), Academic Press, New York, London.
84. G.A.J.M. Van der Hofstad, J.A. Foekens,
P.J. Van den Elsen und H.O. Voorma,
Eur. J. Biochem. 66, 181 (1976).

Lebenslauf

24.7.1945 geboren in Berlin
Eltern: Gärtnermeister Karl Faber
Schneiderin Hanna Faber, geb. Großmann

1952-1956 Volksschule Bad Harzburg

1956-1965 Gymnasium Bad Harzburg

1965 Abitur, Gymnasium Bad Harzburg

1965-1967 Apotheken-Praktikum, Salzgitter-Lebenstedt

1967 Pharmazeutische Vorprüfung, Braunschweig

1968-1971 Studium der Pharmazie, Technische Universität
Berlin und Freie Universität Berlin

1971 Pharmazeutisches Staatsexamen, Berlin

1971-1973 Wissenschaftliche Assistentin im Institut
für Anaesthesiologie (FB 04, WE 01) der Freien
Universität Berlin

1973-1976 Wissenschaftliche Angestellte im Institut
für Molekularbiologie und Biochemie (FB 01,
WE 03) der Freien Universität Berlin

seit

1.1.1977 Wissenschaftliche Assistentin im Institut
für Molekularbiologie und Biochemie der
Freien Universität Berlin

